東京農工大学学術機関リポジトリ

Title	人工水環境に生息するレジオネラ属菌の検出方法の高精度化に関する研究 Development of improved methods for detection of Legionella spp. in artificial water environments
Author(s)	井上, 浩章
Citation	
Issue Date	2015-03-16
URL	http://hdl.handle.net/10636/549
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

人工水環境に生息するレジオネラ属菌の検出方法の高精度化に関する研究

2015 年 3 月

井上　浩章

目次

第 1 部　はじめに

第 1 章　序論　1

第 2 部　レジオネラ属菌培養検査の高精度化

第 2 章　レジオネラ属菌培養検査の前処理に用いる酸性緩衝液の改良　10
2.1　材料と方法　10
2.1.1　水試料
2.1.2　供試菌株および試薬
2.1.3　酸性緩衝液
2.1.4　酸性緩衝液の評価
2.1.5　細菌類に対する酸処理の効果
2.1.6　培養法による環境水からのレジオネラ属菌検査
2.2　結果　12
2.2.1　水質の影響
2.2.2　酸性緩衝液の比較
2.2.3　酸性リン酸緩衝液の有効性
2.3　考察　27

第 3 章　レジオネラ属菌培養検査に用いる新規選択培地の開発　29
3.1　材料と方法　29
3.1.1　供試菌株および培養条件
3.1.2　抗真菌剤およびレジオネラ属菌に対する抗菌活性の評価
3.1.3　選択培地の調製
3.1.4　選択培地の評価
3.1.5　冷却塔水を用いた CATα培地の評価
3.1.6　冷却塔水，浴槽水のレジオネラ属菌検査および CATα培地による再検査
3.2　結果　33
3.2.1　レジオネラ属菌に対する抗真菌剤の影響
3.2.2　糸状菌に対する抗真菌剤の効果
3.2.3　*L. pneumophila* の検出に及ぼす CATα培地の影響

3.2.4　CATα培地を用いたレジオネラ属菌の検出
3.2.5　レジオネラ属菌の再検査における CATα培地の有効性
3.3　考察　42

第 3 部　遺伝子検出法によるレジオネラ属菌検査の迅速化および高精度化

第 4 章　PCR 法および LAMP 法による浴槽水からのレジオネラ属菌の検出に関する検討　45
4.1　材料と方法　47
4.1.1　次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いた試験
4.1.2　各種殺菌剤を用いた試験
4.1.3　試料水の濃縮および培養法，PCR 法による *L. pneumophila* の検出
4.1.4　浴槽水の検査試料
4.1.5　培養法および PCR 法，LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出
4.1.6　DNA の精製
4.1.7　温泉水に含まれる懸濁物質の元素分析
4.2　結果　49
4.2.1　塩素による *L. pneumophila* の DNA の分解
4.2.2　塩素以外の殺菌剤による *L. pneumophila* の DNA の分解
4.2.3　浴槽水から培養法によるレジオネラ属菌検出結果
4.2.4　浴槽水から LAMP 法および PCR 法によるレジオネラ属菌検出結果
4.2.5　温泉水中の懸濁物質の成分
4.2.6　浴槽水から LAMP 法および培養法によるレジオネラ属菌検出結果
4.2.7　浴槽設備の化学的殺菌洗浄結果
4.3　考察　61

第 5 章　EMA-qPCR 法による浴槽水，冷却塔水からのレジオネラ属菌の検出　63
5.1　材料と方法　63
5.1.1　水試料
5.1.2　レジオネラ属菌の培養検査
5.1.3　EMA 処理および DNA 抽出・精製
5.1.4　qPCR 法によるレジオネラ属菌の検出
5.1.5　EMA 処理効果の評価
5.2　結果　65
5.2.1　浴槽水からのレジオネラ属菌検出
5.2.2　冷却塔水からのレジオネラ属菌検出

5.2.3　冷却塔水の EMA 処理効果の評価結果
5.3　考察　69

第 6 章　EMA-qPCR 法, クローンライブラリーによる環境水中のレジオネラ属菌の多様性の解析　72
6.1　材料と方法　72
6.1.1　水試料
6.1.2　レジオネラ属菌の培養検査
6.1.3　EMA 処理および DNA 抽出・精製
6.1.4　レジオネラ属菌および *L. pneumophila* の DNA 定量
6.1.5　レジオネラ属菌のクローンライブラリー解析
6.1.6　塩基配列のアクセッションナンバー
6.2　結果　79
6.2.1　培養法と EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌検出結果の比較
6.2.2　レジオネラ属菌のクローンライブラリー解析
6.3　考察　87

第 4 部　おわりに

第 7 章　総合討論　89

参考文献・引用文献　93

謝辞　101

付記　102

第 1 部　はじめに

第 1 章　序論

レジオネラ属菌はグラム陰性の桿菌で土壌や淡水など自然界に広く生息している．自然界ではアメーバ類などの細菌捕食性原生動物に寄生しての増殖（Rowbotham, 1980，図 1-1），藻類との共生による増殖（Tison *et al.*, 1980）が知られている．また，冷却塔（図 1-2）や浴槽などの人工水環境でも増殖し，ここでのレジオネラ属菌の増殖の場は主にバイオフィルム内に存在するアメーバ類だとされる．アメーバ類等に寄生したレジオネラ属菌は宿主細胞内で増殖し，やがて宿主細胞を破壊して水中に遊出する．そして，つぎの宿主に感染して増殖するという生活環を持つ（Fields *et al*., 2002）．人工水環境の設備から発生したレジオネラ属菌を含むエアロゾルがレジオネラ症（Legionellosis）を引き起こす原因となる．1976 年の夏，アメリカ合衆国のフィラデルフィアで開かれた在郷軍人の集会で発生した集団感染が最初の報告例（Fraser *et al*., 1977）で，このときの感染源は集会が開かれたホテルの冷却塔であることが後の調査で明らかとなった（Brenner *et al*., 1979）．血液寒天培地等の一般的な病原性細菌用の培地に発育しなかったため，病原体の検出は困難を極めたが，McDade *et al.*（1977）はモルモットの腹腔内で増殖させることに成功した．その後，Feeley *et al.*（1978）は Mueller-Hinton 寒天培地にヘモグロビンと IsoVitaleX を添加した人工培地による培養に初めて成功した．さらに，酵母エキスを基礎栄養として活性炭粉末を発育阻害因子の除去のために添加し，さらに必須栄養素である L-システイン，発育因子の有機酸鉄を添加した人工培地（CYE 寒天培地）によって良好に発育させることに成功した（Feeley *et al*., 1979）．検出された病原体は在郷軍人（Legion）にちなんで *Legionella pneumophila* と命名された（Brenner *et al*., 1979）．

レジオネラ症はレジオネラ肺炎（Legionnaires' disease，在郷軍人病）とポンティアック熱（Pontiac fever）の 2 つの病態に分けられる．レジオネラ肺炎は適切な治療がなされない場合，重篤化して死に至ることもあり，致命率は 15%から 20%である（Fields *et al*., 2002）．一方，ポンティアック熱はインフルエンザ様の熱性疾患で特に治療せずとも自然治癒するとされる（吉田ら, 1995）．ヒトの呼吸器内に入り込んだレジオネラ属菌はマクロファージの殺菌機構から逃れることができ，しかもその細胞内で増殖する．また，レジオネラ属菌はβ-ラクタマーゼ産生性のため，通常の肺炎治療に用いられるβ-ラクタム剤は無効である．また，アミノグルコシド系抗生物質は細胞内への移行性が悪いため治療効果が得られない（Fraser *et al*., 1978）．レジオネラ症の治療にはリファンピシンおよびフルオロキノロン系，マクロライド系の抗生物質が有効とされる．

レジオネラ属にはこれまで 57 種類（Fields *et al*., 2002; Park *et al*., 2003; Scola *et al*., 2004; Kuroki *et al*., 2007; Lück *et al*., 2010; Yang *et al*., 2012; Edelstein *et al*., 2012; Pearce *et al*., 2012; Campocasso *et al*., 2012）が記載されているが，レジオネラ属は全てバイオセーフティーレベル 2 に分類され，レジオネラ症は第 4 類感染症に規定されている．実際にヒトからの臨床分離株として得られた菌種として *L.*

pneumophila, *Legionella bozemanii*, *Legionella micdadei*, *Legionella longbeachae*, *Legionella wadsworthii*, *Legionella hackeliae*, *Legionella birminghamensis*, *Legionella cincinnatiensis*, *Legionella tucsonensis*, *Legionella lansingensis*, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, *Legionella jordanis*, *Legionella oakridgensis*, *Legionella feeleii*, *Legionella parisiensis*, *Legionella maceachernii*, *Legionella anisa*, *Legionella santicrucis*, *Legionella sainthelensis*, *Legionella nagasakiensis*, *Legionella steelei*, *Legionella cardiaca* の 23 種が報告されている（Fields *et al*., 2002; Yang *et al*., 2012; Edelstein *et al*., 2012; Pearce *et al*., 2012）が，レジオネラ属であれば全てヒトに対し感染性を持つものとして扱われる．*L. pneumophila* の人工培地上での倍加時間は 4 時間から 6 時間で，培地上に独立した集落（コロニー）が形成されるまでには 5 日程度の培養が必要である．自然環境での発育可能温度は 20℃から 42℃で，実験室での発育至適温度は 36℃前後である．35℃以上での培養により菌体がフィラメント状に発育することが報告されており（Piao *et al*., 2007），35℃未満の培養では桿菌の形態をとる．

日本でのレジオネラ症の報告例としては冷却塔水でのポンティアック熱集団感染（薮内ら, 1995b），温泉等の温浴施設でのレジオネラ肺炎集団感染（薮内，縣, 2004），給湯水や加湿器でのレジオネラ肺炎（山下ら, 1998），園芸用土でのレジオネラ肺炎（岡崎ら, 1998）等があるが，温泉等の温浴施設での感染，死亡例が多いのが特徴である．しかしながら冷却塔水も感染のリスクは決して低くないため，温浴施設と同様に注意が必要である．レジオネラ属菌対策の第一歩は水系のレジオネラ属菌汚染状況を把握することである．2001 年 4 月から 2012 年 3 月にかけて実施した各種水利用設備のレジオネラ属菌汚染状況（井上ら, 2013）を図 1-3 に示すが，いずれの設備からもレジオネラ属菌が検出されており，レジオネラ属菌対策の重要性が伺える．レジオネラ症防止指針（2009）には，エアロゾルを直接吸引する可能性の低い人工環境水で 100 CFU/100 ml 以上，エアロゾルを直接吸引する恐れのある人工環境水で 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された場合，直ちに菌数を減少させるための対策を講じるとある．また，公衆浴場における水質基準等に関する指針（2003）によれば，浴槽水のレジオネラ属菌の管理基準は「検出されないこと」（10 CFU/100 ml 未満）と定められている．したがって，レジオネラ症の発生を防止するためには，レジオネラ属菌検査による汚染実態の把握とレジオネラ属菌の防除対策を継続的に行い，人工水環境中のレジオネラ属菌数を抑制することが重要である（縣, 2010）．

レジオネラ属菌の検査方法としては培養法，蛍光抗体染色法，遺伝子検出法，免疫クロマトグラフ法，*in situ* ハイブリダイゼーション法などがあるが，その中でも培養法はレジオネラ属菌検査の標準方法として広く用いられ，レジオネラ属菌の生菌を得られる唯一の方法として重要である．前述した通り，レジオネラ属菌の培養には活性炭を添加した特殊な培地が必要なためレジオネラ属菌の検出を目的として検査しなければ，決してレジオネラ属菌を検出できない．つまり，一般細菌等の検査で偶然にレジオネラ属菌が検出されることはあり得ない．培地に添加する活性炭については寒天に不純物として含まれるオレイン酸がレジオネラ属菌の発育を阻害するのでそれを除去するため（Pine *et al*., 1979），培地作製時に発生する活性酸素を除去するため（Hoffman *et al*., 1983）とい

う報告がある．著者らも *L. pneumophila* の液体培地に合成吸着剤を添加して，培養後の吸着剤から *L. pneumophila* 自身に対する発育阻害物質として elemental sulfur（Inoue *et al*., 2002）および indole 化合物（Inoue *et al*., 2004）を単離，同定した．これらの様々な発育阻害因子を除去し，レジオネラ属菌の発育を良くするためには培地に添加する活性炭は重要な働きを持つ．

レジオネラ属菌の培養法による検査は国際的な標準の試験方法である ISO11731 に従う．日本ではレジオネラ症防止指針や JIS K. 0350-50-10 に記載の検査方法が一般的だが，これらの検査方法も ISO11731 からの引用であり，本質的に変わるところはない．検水を遠心分離またはメンブレンフィルターを用いたろ過により 100 倍に濃縮し，レジオネラ属菌以外の細菌類や真菌類（夾雑微生物）を処理するために pH 2.2 の 0.2 M HCl-KCl 緩衝液（Bopp *et al*., 1981）または 50℃（Dennis *et al*., 1984b）で前処理を行う．前処理後の濃縮液をレジオネラ属菌の選択培地である GVPC 培地（Dennis *et al*., 1984a）や WYO 培地（奥田ら, 1984），MWY 培地（Edelstein, 1982）等に接種し，37℃のインキュベーター内で培養する．6 日後に形成された灰白色のレジオネラ属菌の特徴を持つコロニーを計数する．レジオネラ属菌かどうか疑わしいコロニーについては，L-システイン要求性試験のためレジオネラ属菌の非選択培地である BCYE 培地と L-システイン不含の BCYE 培地または血液寒天培地にコロニーの一部を画線培養し，更に 2 日間培養する．L-システイン要求性が認められた株を推定レジオネラ属菌として培地上のコロニー数を数えて検水 100 ml あたりの菌数に換算する．培地上のコロニー1 個が 10 CFU/100 ml に相当し，この試験の検出下限値である．L-システイン要求性試験の替わりに免疫クロマトグラフ法を用いてレジオネラ属菌の判定をすることも可能で，その場合 2 日間の培養を省略でき検査時間を短縮することが可能である（Inoue *et al*., 2007）．必要に応じて免疫血清によるスライド凝集法，DNA-DNA ハイブリダイゼーション法，16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性評価により菌種を同定する．培養法によるレジオネラ属菌検査の大きな課題はレジオネラ属菌以外の夾雑微生物が選択培地上を覆うように発育することでレジオネラ属菌の検出が妨げられる場合（図 1-4）があることが挙げられ，この課題を解決することはレジオネラ属菌検査の精度を向上させるためにも極めて重要だと考える．

遺伝子検出法によるレジオネラ属菌の検査はレジオネラ症防止指針（2009）にも記載され検査方法として一般化した．標的遺伝子としては 16S または 5S rRNA 遺伝子や *mip*（macrophage infectivity potentiator）遺伝子を用い，PCR（Polymerase chain reaction）法や LAMP（Loop-mediated isothermal amplification）法（Notomi *et al*., 2000）によって DNA を増幅して検出する．16S や 5S rRNA 遺伝子を標的とする場合はレジオネラ属を広範囲に捉えることも可能で，環境中のレジオネラ属菌を広く検出したい場合に有効である．遺伝子検出法の最大の利点は検出までの所要時間が短いことで，結果が得られるまでに培養法だと 8 日から 10 日掛かるのに対し，遺伝子検出法では 2 時間から 3 時間程度である．遺伝子検出法の課題としてはレジオネラ属菌の生菌だけでなく死菌や DNA 断片のみであっても検出するため，培養検査法と比較するとレジオネラ属菌陽性率が高くなることが挙げられる．すなわち，レジオネラ属菌が存在する水系を殺菌剤により化学洗浄した場合，培養検査法

ではレジオネラ属菌不検出となるが，遺伝子検出法では陽性と判定されることがしばしば起こる．また，菌数の推定が難しいことも挙げられるが，リアルタイム PCR 法を用いた定量 PCR によってレジオネラ属菌の遺伝子を定量して菌数に換算する手法も用いられる．しかしながら，レジオネラ属菌の生菌，死菌ともに検出するため，あくまでも死菌も含めた遺伝子量からの菌数換算となる．よって，遺伝子の定量値から培養法の結果を予測することは現時点では困難である．試料を Ethidium monoazide（EMA）処理することで死菌由来の DNA を修飾し DNA polymerase による DNA 合成を抑制して，生菌由来の DNA を選択的に増幅・検出する方法も報告されている（Nogva *et al*., 2003, 図 1-5）．この手法によればレジオネラ属菌の生菌を対象とした遺伝子検出が可能となり，レジオネラ属菌の死菌の DNA に起因する陽性率を低減させることが期待される．また，環境中には生きてはいるが人工培地上での発育能を失ったレジオネラ属菌や，もともと現行の人工培地に発育できない *Legionella lytica* のような *Legionella*-like amoebal pathogen（LLAP）と呼ばれる偏性細胞内寄生性のレジオネラ属菌（Hookey *et al*., 1996; Adeleka *et al*., 1996）といった Viable but nonculturable（VBNC）状態のレジオネラ属菌が存在するが，これら培養法で検出できないレジオネラ属菌の存在は遺伝子検出法と培養法の結果の相違の主要因となり得るため，これらの存在を解明することは，レジオネラ属菌の培養検査法の結果と遺伝子検出法の結果を比較検討する上で極めて重要な知見となるであろう．

本論文では環境水からのレジオネラ属菌の検出における様々な問題を解決するための取り組みについて述べる．第 2 章ではレジオネラ属菌の培養検査法の精度を向上させるために前処理に用いる酸性緩衝液について検討した．第 3 章では真菌の発育抑制に優れるレジオネラ属菌用選択培地の開発を試み，新規レジオネラ用選択培地の有効性を多検体の環境水で評価した．第 4 章では *L. pneumophila* を塩素処理した際の PCR による検出挙動を調査した．また，浴槽水から PCR 法と LAMP 法，培養法でレジオネラ属菌を検出して遺伝子検出法の有効性を評価した．そして，浴槽水から LAMP 法によりレジオネラ属菌を検出した結果と培養検査の結果を多検体で比較して，LAMP 法の有用性を検証した．第 5 章では PCR 法における EMA 処理の効果を環境水で評価した．第 6 章では EMA-qPCR 法によってレジオネラ属菌由来の DNA と *L. pneumophila* 由来の DNA をそれぞれ定量し，環境水中の *L. pneumophila* の存在比率を求めた．また PCR で得られるレジオネラ属菌の遺伝子をクローンライブラリーにより解析し，培養法と PCR 法で検出されるレジオネラ属菌の相違について調査した．

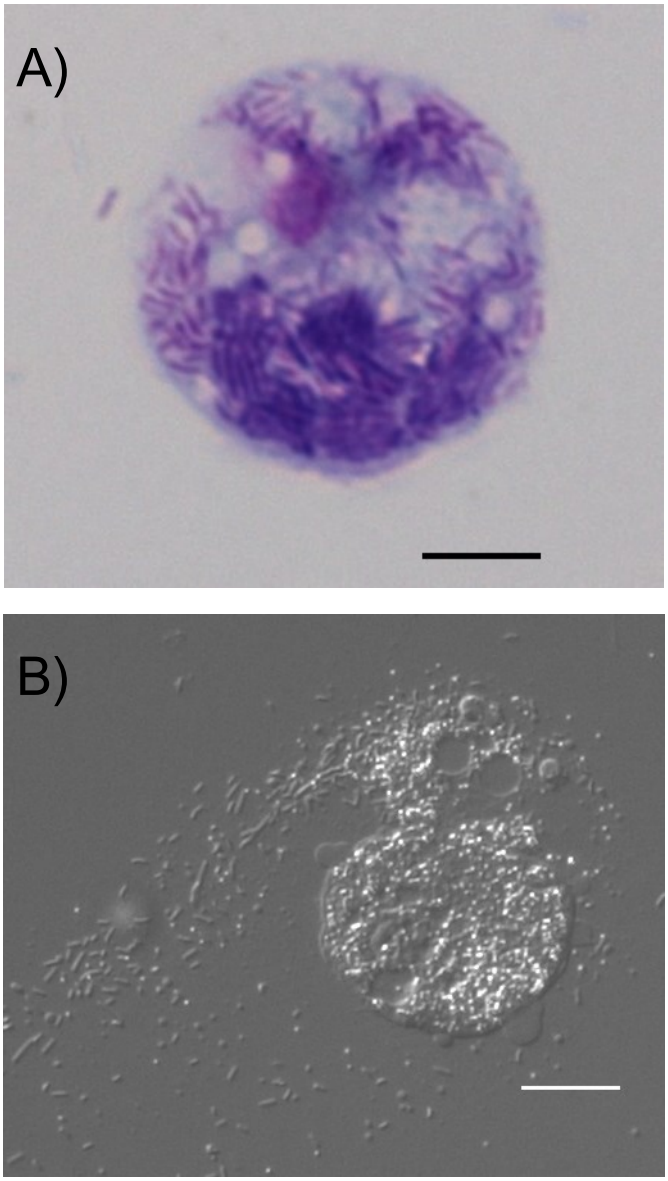

図 1-1　*Acanthamoeba* sp.（環境分離株）内で増殖した *Legionella pneumophila* ATCC33152 のギムザ染色像（A），*Acanthamoeba* sp.（環境分離株）から遊出する *L. pneumophila* ATCC33152 の微分干渉観察像（B）．スケールバーの長さは A，B どちらも 5 μm

A)

B)

図 1-2　開放式冷却塔の外観（A），開放式冷却塔内部の下部水槽（B）．冷却塔の下部水槽には冷却水が溜まっており，冬季も運転時は水温 25℃程度を保つ．レジオネラ属菌は土埃とともに冷却塔に混入するとされる．

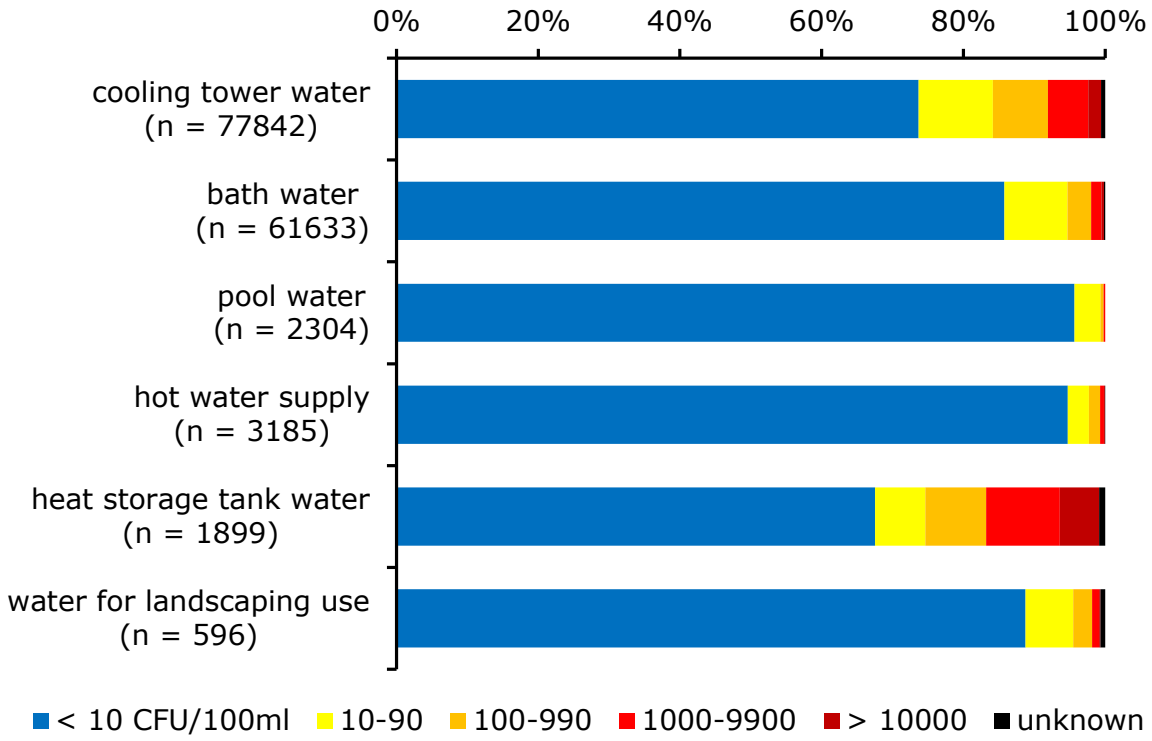

図 1-3　2001 年 1 月から 2012 年 12 月にかけて実施した各種水利用設備から検出されたレジオネラ属菌の菌数分布（井上ら, 2013）．冷却塔水の 25.9%，浴槽水の 14.1%，プール水の 4.3%，給湯水の 5.2%，蓄熱槽水の 31.9%，修景水の 10.6%からレジオネラ属菌が検出された.

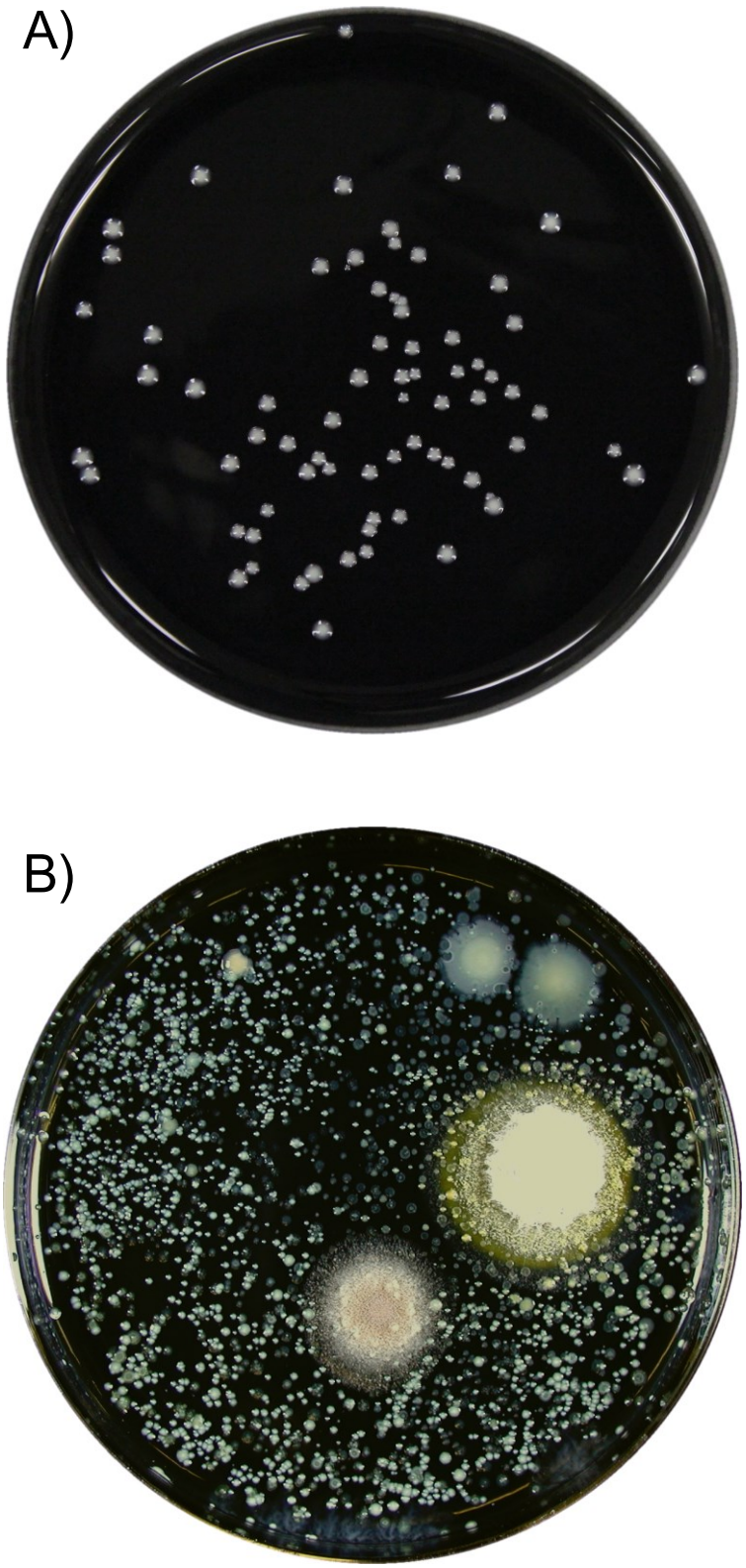

図 1-4　GVPC 選択培地にレジオネラ属菌のみが発育した様子（A），GVPC 選択培地にレジオネラ属菌以外の細菌類や真菌類が全体を覆うように発育した様子（B）.

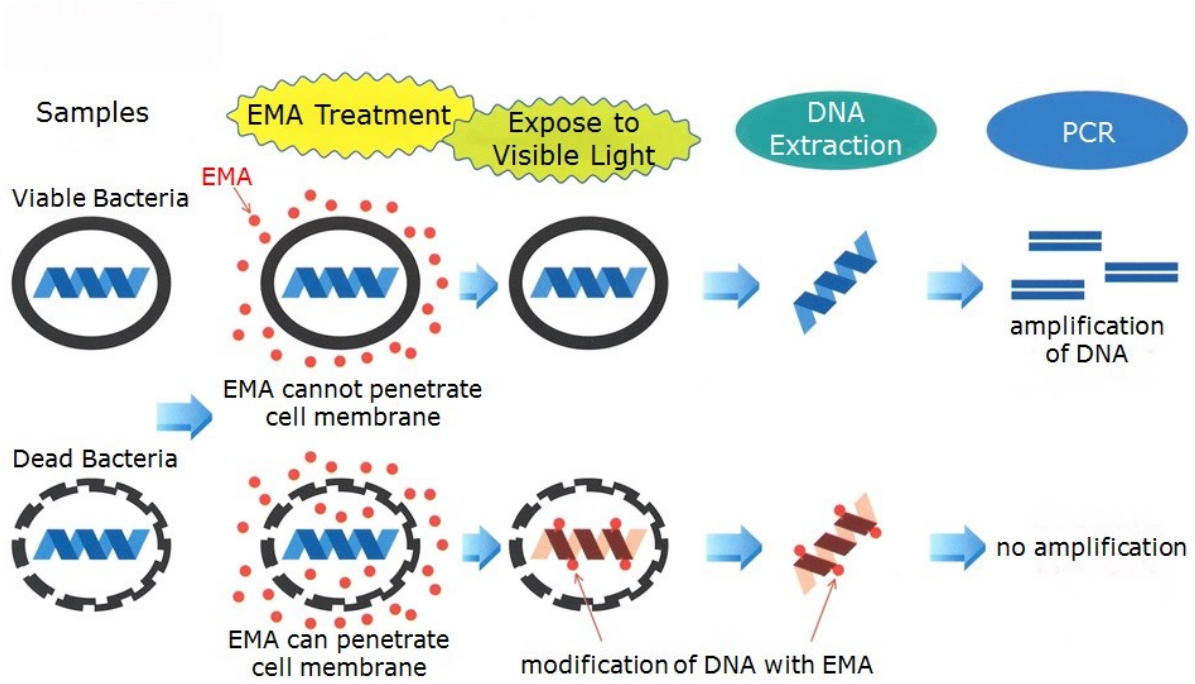

図 1-5　EMA 処理の原理（タカラバイオ製品カタログ「PCR による生菌由来 DNA の選択的な検出法」よりタカラバイオ㈱の許可を得て改変・転載）．EMA は細胞膜が完全な細菌には浸透できないが，細胞膜に損傷を受けた細菌内部には浸透でき，可視光の照射によって DNA と共有結合する．EMA で修飾された DNA は PCR の鋳型とならないため，PCR による DNA 増幅が抑制される．

第 2 部　レジオネラ属菌培養検査の高精度化

第 2 章　レジオネラ属菌培養検査の前処理に用いる酸性緩衝液の改良

環境水のレジオネラ属菌汚染を正確に掴むことはレジオネラ属菌対策の第一歩で，そのためには精度良いレジオネラ属菌検査が求められる．レジオネラ属菌の培養検査は標準の検査方法として広く用いられるが，レジオネラ属菌よりも発育速度の速いレジオネラ属菌以外の細菌類や真菌類（夾雑微生物）が選択培地上を覆うように発育し，レジオネラ属菌の発育を妨害することで，試料中のレジオネラ属菌を検出できなくなる場合（検出不能）があり，検査精度を低下される原因となる．レジオネラ属菌培養検査の前処理には HCl-KCl 緩衝液が用いられるが、HCl-KCl 緩衝液は十分な緩衝能を持たず，酸処理が不十分となることが予測される．そこで本章ではレジオネラ属菌検査時の検出不能率を低減させるために，前処理に用いる酸性緩衝液の改良を試みた．

2.1　材料と方法

2.1.1　水試料

試験に用いる試料水は高圧蒸気滅菌したポリプロピレン製の 500ml 容器に，各地の冷却塔や温泉等の浴槽から採水し，採水後は冷蔵し速やかに試験に用いた．試料水の水質は，pH をガラス電極式の pH メーター（HM-30S，TOA DKK），電気伝導率を電気伝導率計（CM-40S，TOA DKK），塩化物イオン濃度を塩化物イオン計（IM-5S，TOA DKK）で測定した．全硬度およびアルカリ度は滴定法で測定した．

2.1.2　供試菌株および試薬

本章の試験に用いた細菌株を表 2-1 に示す．レジオネラ属菌は BCYEα培地（Edelstein, 1981），*Pseudomonas aeruginosa* は標準寒天培地（日水製薬製）を用いて 37℃ で培養した．試薬類は特に断らない限りキシダ化学株式会社製の特級を用いた．

2.1.3　酸性緩衝液

本検討では 3 種類の酸性緩衝液を比較した．0.2 M HCl-KCl 緩衝液（pH 2.2）は 0.2 M 塩酸と 0.2 M KCl を混合して作製した．0.2 M 酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）は 0.2 M リン酸と 0.2 M KH_2PO_4 を混合

して作製した．0.2 M マッキルベイン緩衝液（pH 2.2）は 0.2 M クエン酸（Sigma）と 0.2 M Na_2HPO_4 を混合して作製した．いずれの緩衝液も pH を測定しながら混合し，pH を 2.2 に調整した．

2.1.4　酸性緩衝液の評価

HCl-KCl 緩衝液，酸性リン酸緩衝液，マッキルベイン緩衝液の緩衝能を滴定法により測定した．200 ml のビーカーに 100 ml の各緩衝液を入れてマグネチックスターラーで撹拌しながら 0.1 M NaOH を 100 µl ずつ添加し，そのときの pH を測定した．

次に, 10 g の炭酸水素ナトリウムを 1000 ml の脱イオン水に溶解させ, 全アルカリ度がおよそ 6000 mg/L（as $CaCO_3$）の溶液を調製し，脱イオン水で希釈して全アルカリ度が 3000，2000，1000，500，250 mg/L（as $CaCO_3$）の溶液を調製した．次に，希釈調製した炭酸ナトリウム水溶液を試験管に 1 ml ずつ分注し，0.2 M HCl-KCl 緩衝液を 1 ml ずつ添加し，そのときの pH を測定した．同様に 0.2 M 酸性リン酸緩衝液，0.2 M マッキルベイン緩衝液についても添加したときの pH を測定した．

次に, BCYEα寒天培地から寒天と活性炭末を除いて調製した BYEα液体培地に酸性緩衝液を添加したときの pH の変化を調べた．200 ml のビーカーに 100 ml の BYEα液体培地を入れてマグネチックスターラーで攪拌しながら 0.2 M HCl-KCl 緩衝液を 100 µl ずつ添加し，そのときの pH を測定した．同様に 0.2 M 酸性リン酸緩衝液，0.2 M マッキルベイン緩衝液についても添加したときの pH を測定した．

2.1.5　細菌類に対する酸処理の効果

環境水 8 検体の pH および細菌数を測定した. 各検体を 1 ml ずつ 2 本の滅菌済み試験管に分注し，0.2 M HCl-KCl 緩衝液（pH 2.2）および 0.2 M 酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）をそれぞれに 1 ml ずつ混合した．10 分間接触後，細菌数および pH を測定した．細菌数を測る際は，各酸処理緩衝液と 10 分間接触後，ただちに 1 ml を採取し，4 ml の 50 mM のリン酸緩衝液（pH 7）に添加し，pH の影響を除去した．中和後の希釈試料を標準寒天培地で混釈して 37℃で培養し，6 日後に細菌のコロニー数を測定した．次に，レジオネラ属菌の培養検査時に検出不能の原因となる緑膿菌に対する酸処理の効果を検証した．*Pseudomonas aeruginosa* IAM1514 株を脱イオン水に懸濁し，菌数を 10^4 CFU/ml に調製して 1 ml ずつ 5 本の滅菌済み試験管に分注した．0.2 M リン酸緩衝液（pH 2.2，2.5，3.0，4.0，5.0）をそれぞれ 1 ml ずつ混合し，10 分間接触させた後ただちに 1 ml を採取し，4 ml の 50 mM のリン酸緩衝液（pH 7）に添加して中和した．中和後の希釈試料を標準寒天培地で混釈して 37℃で培養し，2 日後に *P. aeruginosa* のコロニー数を測定した．次に，レジオネラ属菌に対する酸処理の影響を検証した．各レジオネラ属菌を脱イオン水に懸濁し，菌数を 10^3 から 10^4 CFU/ml に調製して 1 ml ずつ滅菌済み試験管に分注した．0.2 M 酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）を 1 ml ずつ混合し，5，10，20

分後に 200 µl を採取し BCYEα培地に接種した．37℃で 6 日間培養しレジオネラ属菌のコロニー数を計数した.

2.1.6　培養法による環境水からのレジオネラ属菌検査

レジオネラ属菌の検査方法は標準方法（ISO11731）に準じた．はじめに 400 ml の試料水を遠心濃縮法により 100 倍に濃縮した．遠心条件は 6400 × *g* で 15℃，30 分間とした．遠心上清はデカンテーションで除去し，沈殿物を 4 ml の滅菌脱イオン水で再懸濁して 100 倍濃縮液とした．100 倍濃縮液を 1 ml ずつ滅菌小試験管に分注し，等量の酸性緩衝液を加えて酸処理した．10 分後に 200 µl を採取し GVPC 培地（Dennis *et al*., 1984a）に接種して 37℃で培養し，6 日後にレジオネラ属菌が疑われるコロニーから 4 個のコロニーを選んで血液寒天培地（5%ウマ脱繊維血液添加普通寒天培地）と BCYEα培地に接種して 37℃で 2 日間培養した．そして，血液寒天培地に発育せず，BCYEα培地に発育したものをレジオネラ属菌として計数した.

2.2　結果

2.2.1　水質の影響

環境水からレジオネラ属菌を培養法で検出する際の前処理用の酸性緩衝液として，酸性リン酸緩衝液とマッキルベイン緩衝液（クエン酸緩衝液）を HCl-KCl 緩衝液と比較した．表 2-2 は冷却塔水および温泉水の水質を示す．冷却塔水，温泉水の水質は様々で全アルカリ度が高い水も含まれていた．次に，冷却塔水，温泉水と各酸性緩衝液を等量混合したときの pH を表 2-3 に示す．この結果から HCl-KCl 緩衝液を用いて冷却塔水や温泉水を酸処理した場合，処理液の pH の範囲が広く（2.4 から 7.2），試料によっては十分な pH の低下が認められないことが明らかとなった．次に，試料水のアルカリ度が酸処理に与える影響を表 2-4 に示す．全アルカリ度が 2000 mg/L の溶液を酸処理したときは酸性リン酸緩衝液，マッキルベイン緩衝液ともに pH 2.7 まで低下した．全アルカリ度が 1000 mg/L 以下の溶液を酸処理したときは酸性リン酸緩衝液の方がマッキルベイン緩衝液よりも pH を低下させた．逆に全アルカリ度が 3000 mg/L 以上の溶液を酸処理したときはマッキルベイン緩衝液の方が酸性リン酸緩衝液よりも pH を低下させた.

2.2.2　酸性緩衝液の比較

HCl-KCl 緩衝液, 酸性リン酸緩衝液, およびマッキルベイン緩衝液の緩衝能を滴定法で評価した．各酸性緩衝液に 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えたときの pH の変化を図 2-1 に示す．HCl-KCl

緩衝液の緩衝能は酸性リン酸緩衝液，マッキルベイン緩衝液と比較すると明らかに低かった．0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液の添加量が 65 ml くらいまでは酸性リン酸緩衝液の方がマッキルベイン緩衝液よりも pH が低く維持されており，この結果は表 2-3 および 2-4 の結果と一致した．次に BYEα 液体培地に各酸性緩衝液を加えたときの pH の変化を図 2-2 に示す. マッキルベイン緩衝液は BYEα 液体培地の pH を最も低下させ，100 ml の BYEα液体培地に対して約 0.5 ml のマッキルベイン緩衝液の添加で BYEα液体培地の pH は 6.8 以下になった．一方，酸性リン酸緩衝液はマッキルベイン緩衝液と比較して BYEα培地の pH を低下させず，100 ml の BYEα液体培地に対して約 2 ml の酸性リン酸緩衝液の添加でも BYEα液体培地の pH は 6.8 程度に保たれた.

2.2.3　酸性リン酸緩衝液の有効性

これまでの結果から，酸処理に用いる酸性緩衝液として酸性リン酸緩衝液の方がマッキルベイン緩衝液よりも優れていると判断した．そこで，HCl-KCl 緩衝液と酸性リン酸緩衝液を用いてレジオネラ属菌以外の細菌類に対する酸処理の効果を比較した．表 2-5 は HCl-KCl 緩衝液と酸性リン酸緩衝液を用いて環境水の酸処理をしたときの pH と細菌数を示す．酸性リン酸緩衝液は HCl-KCl 緩衝液よりも明らかに酸処理効果が高かった．この結果は，HCl-KCl 緩衝液は緩衝能が低いため，環境水を酸処理するときに低 pH を維持できずにレジオネラ属菌以外の細菌類を十分に処理できないことを示している.

次に，実際の検査で検出不能を引き起こす原因となる *P. aeruginosa* に対する酸処理の効果を評価した．図 2-3 は異なる pH の溶液中での *P. aeruginosa* の生存曲線を示す．*P. aeruginosa* は pH 2.2 で 10 分間または pH 2.5 で 20 分間の処理で検出されなくなった．しかし，pH 3.0 では酸処理効果が弱まり，pH 4.0 や 5.0 では酸処理効果が認められなかった．図 2-4 はレジオネラ属菌に対する酸性リン酸緩衝液の影響を示す．これらの結果から，酸性リン酸緩衝液を用いた酸処理は，試験したレジオネラ属菌に対して影響がないことが明らかとなった．表 2-6 は環境水のレジオネラ属菌検査において HCl-KCl 緩衝液と酸性リン酸緩衝液を用いて酸処理したときのレジオネラ属菌検出状況の比較を示す．HCl-KCl 緩衝液による酸処理では，161 試料中 52 試料（32.3%）からレジオネラ属菌を検出し，5 試料（3.1%）が検出不能だった．一方，酸性リン酸緩衝液による酸処理では，161 試料中 58 試料（36.6%）からレジオネラ属菌を検出し，2 試料（1.2%）が検出不能だった．図 2-5 は表 2-6 で示した 161 検体のうち，いずれかの酸処理でレジオネラ属菌が検出された 63 検体（検出不能となった検体は除外）について，培地上に発育したレジオネラ属菌のコロニー数を散布図で示した．HCl-KCl 緩衝液処理と酸性リン酸緩衝液処理で検出されたレジオネラ属菌数は高い相関（$R^2 = 0.93$）が見られた．また，表 2-7 は 100 倍濃縮検体をそれぞれの酸性緩衝液で酸処理する前後の pH の比較を示す. 遠心濃縮時の沈殿物を滅菌脱イオン水に再懸濁させたときの pH は 4.6 から 8.4 であり検体によりばらついたが, 酸性リン酸緩衝液で酸処理した場合は pH を 2.2 から 2.4 の範囲に維持した.

表 2-1　試験に用いた細菌株

Organism	Serogroup	Source
Legionella pneumophila	1	ATCC33152[a]
Legionella micdadei	—	ATCC33218
Legionella gormanii	—	ATCC33297
Legionella longbeachae	1	ATCC33462
L. pneumophila	1	CT[b]
L. pneumophila	2	Spa[c]
L. pneumophila	3	Spa
L. pneumophila	4	Spa
L. pneumophila	5	Spa
L. pneumophila	6	Spa
L. pneumophila	7	CT
L. pneumophila	8	CT
Legionella jordanis	—	CT
Legionella dumoffii	—	Spa
Pseudomonas aeruginosa	—	IAM1514[d]

[a] American Type Culture Collection.

[b] Isolated from cooling tower water samples.

[c] Isolated from spa water samples.

[d] IAM Culture Collection, Center for Cellular and Molecular Research, Institute of Molecular and Cellular Bioscience, The University of Tokyo.
(Currently, RIKEN Bioresource Center, JCM)

表 2-2　試験に用いた環境水の水質

Parameter	Cooling tower water[a]		Spa water[b]	
	Mean	Range	Mean	Range
pH	8.2	6.4-9.4	7.0	2.0-8.8
Electrical conductivity (mS/m)	80	1.4-270	540	37-3700
Total hardness (mg/L as $CaCO_3$)	250	2-1300	1100	19-9900
Total alkalinity (mg/L as $CaCO_3$)	180	2-560	150	0-1700
Chloride (mg/L)	77	2-570	1600	2-15000

[a] *n* = 32 from different cooling towers

[b] *n* = 13 from different spas

表 2-3　環境水に各種酸性緩衝液を添加したときの pH の比較

Buffer	Cooling tower water[a]		Spa water[b]	
	Mean	Range	Mean	Range
HK[c]	2.9	2.4-6.2	3.1	2.5-7.2
PB[d]	2.3	2.2-2.4	2.3	2.3-2.5
MB[e]	2.3	2.3-2.4	2.3	2.3-2.6

[a] *n* = 32 from different cooling towers

[b] *n* = 13 from different spas

[c] Treatment with 0.2 M HCl-KCl buffer (pH 2.2)

[d] Treatment with 0.2 M acid-phosphate buffer (pH 2.2)

[e] Treatment with 0.2 M McIlvaine buffer (pH 2.2)

表 2-4　各種酸性緩衝液で処理したときのアルカリ度溶液の pH

TA[a]	HK[b]	PB[c]	MB[d]
6000	7.4	5.8	3.4
3000	7.1	3.2	2.9
2000	6.9	2.7	2.7
1000	6.5	2.5	2.6
500	5.8	2.4	2.5
250	2.9	2.3	2.4

[a] Total alkalinity (mg/L as $CaCO_3$)

[b] Treatment with 0.2 M HCl-KCl buffer (pH 2.2)

[c] Treatment with 0.2 M acid-phosphate buffer (pH 2.2)

[d] Treatment with 0.2 M McIlvaine buffer (pH 2.2)

表 2-5　HCl-KCl 緩衝液と酸性リン酸緩衝液の酸処理効果の比較

Sample	No treatment			HK[a]		PB[b]	
	pH	TA[c]	Plate count (CFU/ml)	pH	Plate count (CFU/ml)	pH	Plate count (CFU/ml)
Spa 1	8.0	120	2.9×10^4	2.6	4×10	2.3	< 10
Spa 2	8.5	460	2.5×10^5	5.5	9.6×10^4	2.4	< 10
Spa 3	7.7	110	9.9×10^6	2.6	1.0×10^2	2.3	8×10
Spa 4	8.0	110	2.7×10^2	2.6	< 10	2.3	< 10
Spa 5	9.0	350	2.3×10^2	3.8	8×10	2.4	< 10
CT 6	7.5	32	4.0×10^5	2.5	< 10	2.3	< 10
CT 7	8.5	190	1.4×10^3	2.7	1×10	2.3	1×10
CT 8	8.2	120	9.6×10^3	2.6	< 10	2.3	< 10

[a] Treatment with 0.2 M HCl-KCl buffer (pH 2.2)

[b] Treatment with 0.2 M acid-phosphate buffer (pH 2.2)

[c] Total alkalinity (mg/L as $CaCO_3$)

表 2-6　HCl-KCl 緩衝液と酸性リン酸緩衝液で処理した後のレジオネラ属菌検出結果の比較

Result	HK[a]	PB[b]
Positive	52	58
Negative	104	101
Overgrowth[c]	5	2
Total	161	161

[a] Treatment with 0.2 M HCl-KCl buffer (pH 2.2)

[b] Treatment with 0.2 M acid-phosphate buffer (pH 2.2)

[c] Overgrowth of non-target heterotrophic bacteria

表 2-7　HCl-KCl 緩衝液と酸性リン酸緩衝液による酸処理前後の濃縮試料の pH の比較

pH	NT[a]	HK[b]	PB[c]
Range	4.6-8.4	2.4-5.8	2.2-2.4
Mean	7.1	2.5	2.3

[a] No treatment (before treatment with the acid buffers)

[b] Treatment with 0.2 M HCl-KCl buffer (pH 2.2)

[c] Treatment with 0.2 M acid-phosphate buffer (pH 2.2)

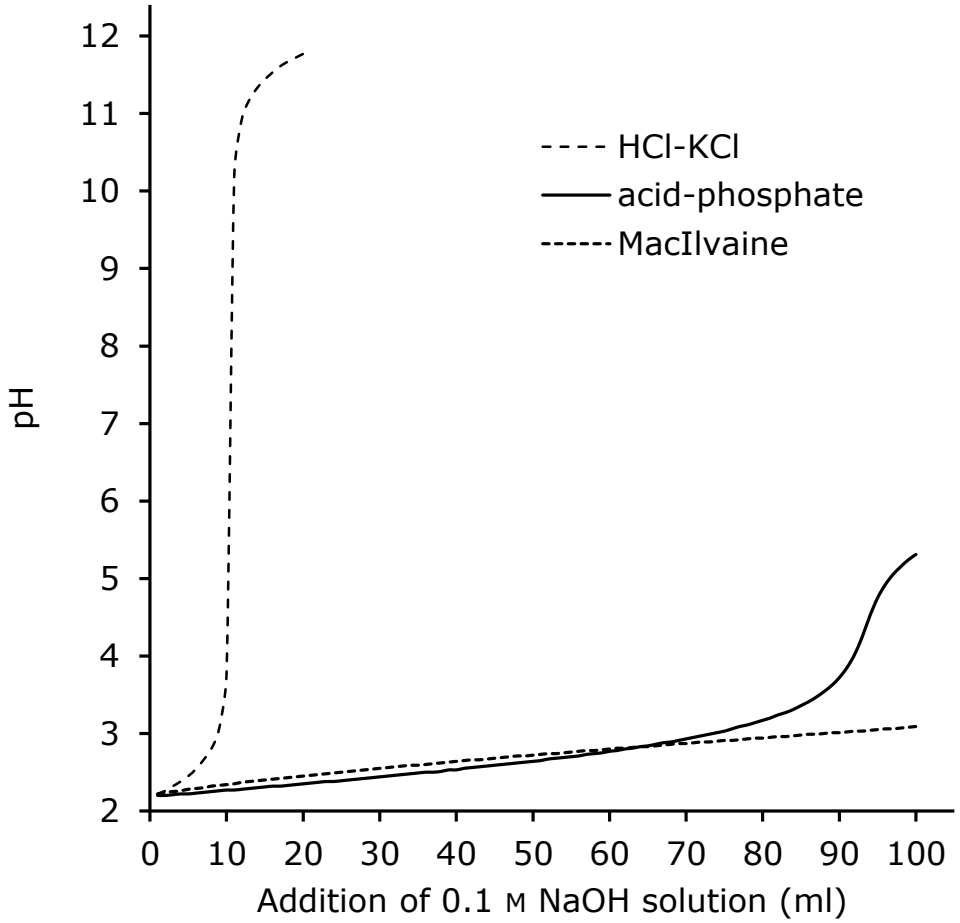

図 2-1　0.1 M NaOH 溶液による各種酸性緩衝液の滴定曲線

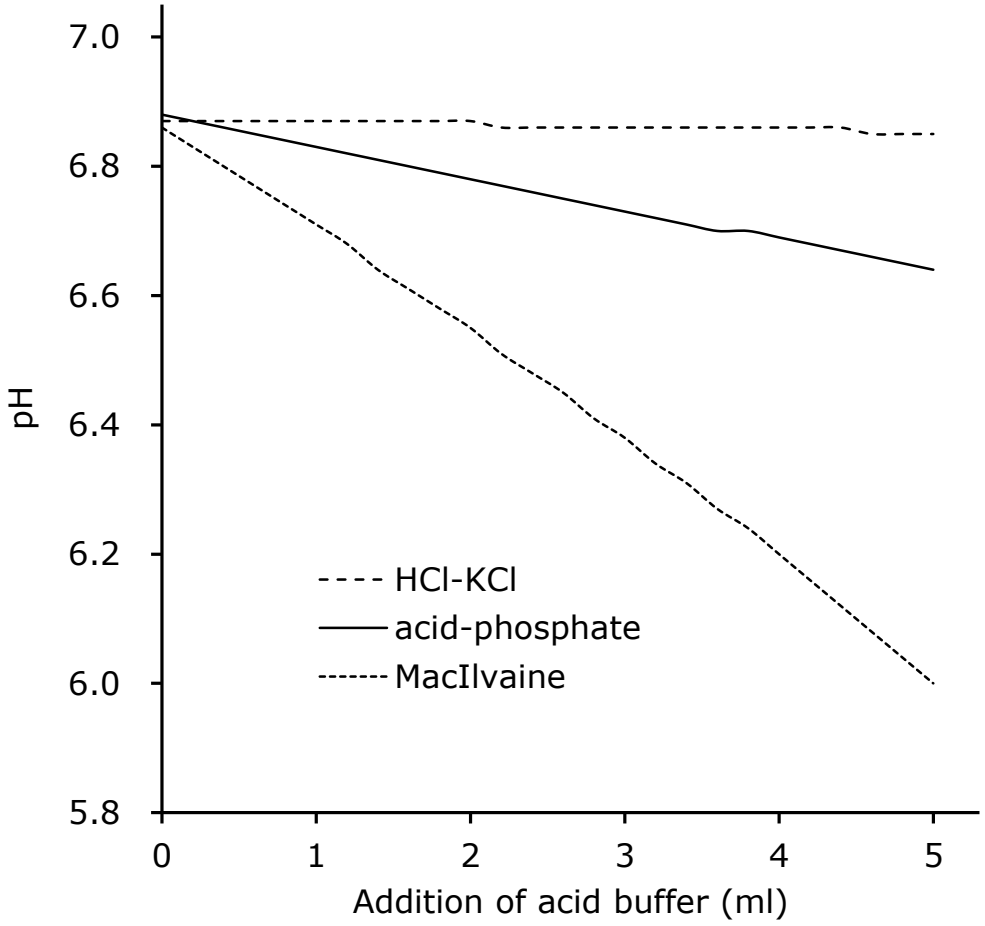

図 2-2　各種酸性緩衝液による BYEα液体培地の滴定曲線

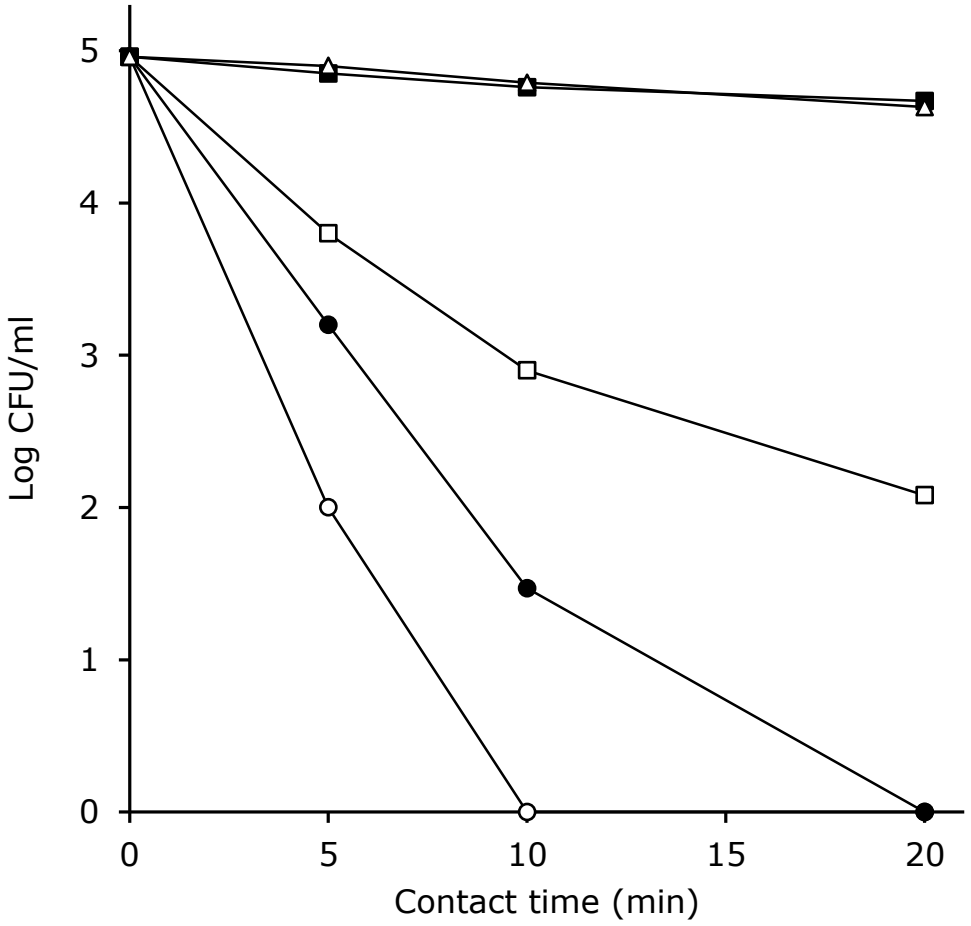

図 2-3　*Puseudomonas aeruginosa* の生存に対する pH の影響

○, pH 2.2; ●, pH 2.5; □, pH3.0; ■, pH 4.0; △, pH 5.0.

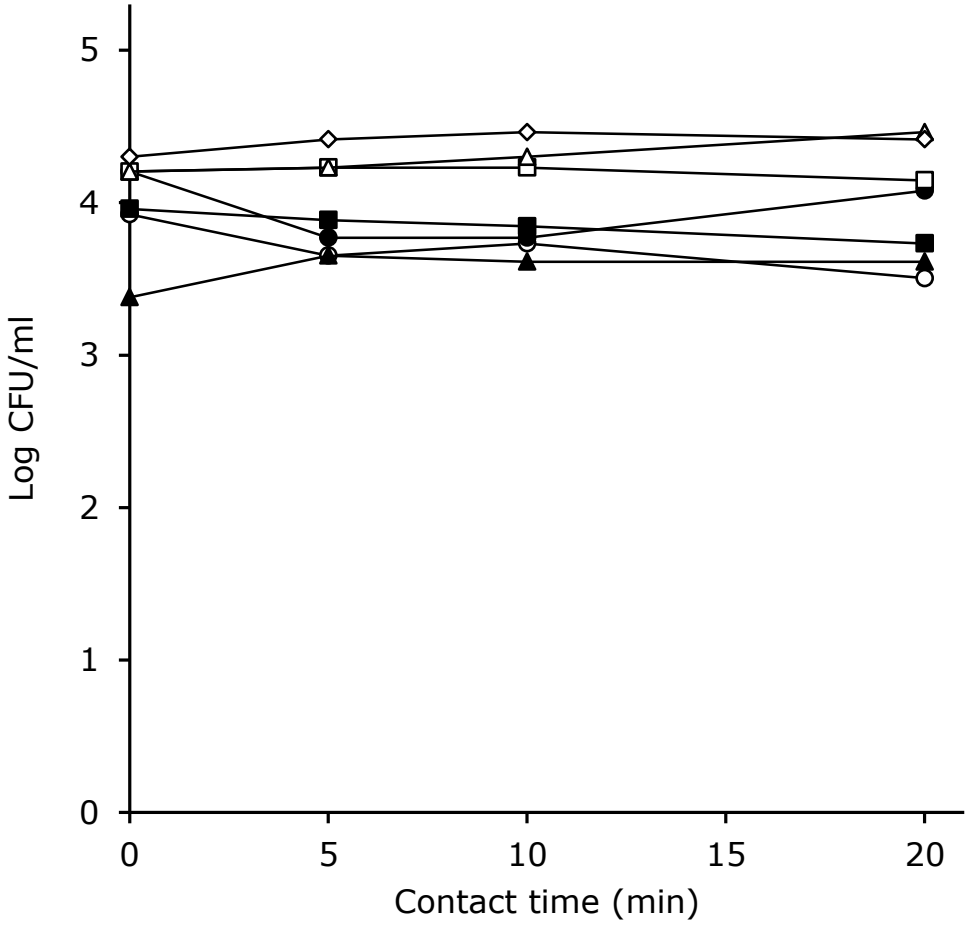

図 2-4-A　レジオネラ属菌に対する 0.2 M 酸性リン酸緩衝液(pH 2.2)の影響

○, *L. pneumophila* ATCC33152; ●, *L. micdadei* ATCC33218;

□, *L. gormanii* ATCC35297; ■, *L. longbeachae* ATCC33462;

△, *L. pneumophila* serogroup 1; ▲, *L. pneumophila* serogroup 2;

◇, *L. pneumophila* serogroup 3.

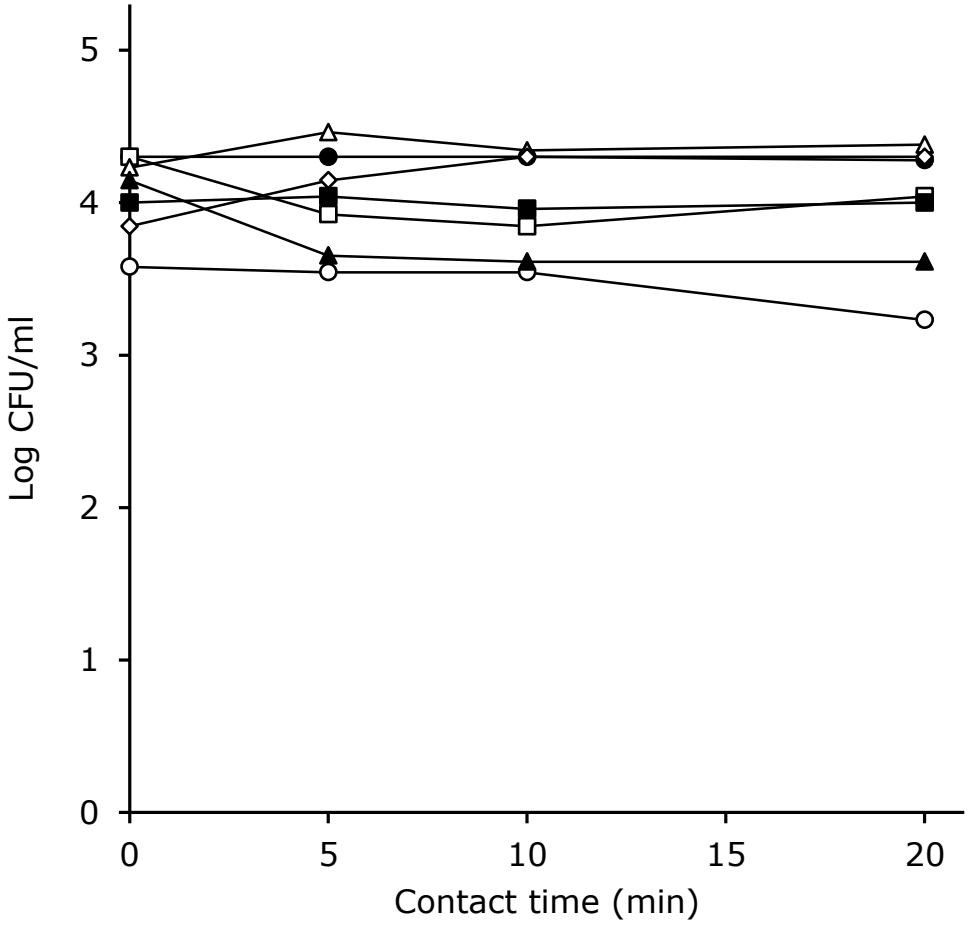

図 2-4-B　レジオネラ属菌に対する 0.2 M 酸性リン酸緩衝液(pH 2.2)の影響

○, *L. pneumophila* serogroup 4; ●, *L. pneumophila* serogroup 5;

□, *L. pneumophila* serogroup 6; ■, *L. pneumophila* serogroup 7;

△, *L. pneumophila* serogroup 8; ▲, *L. jordanis*;

◇, *L. dumoffii*.

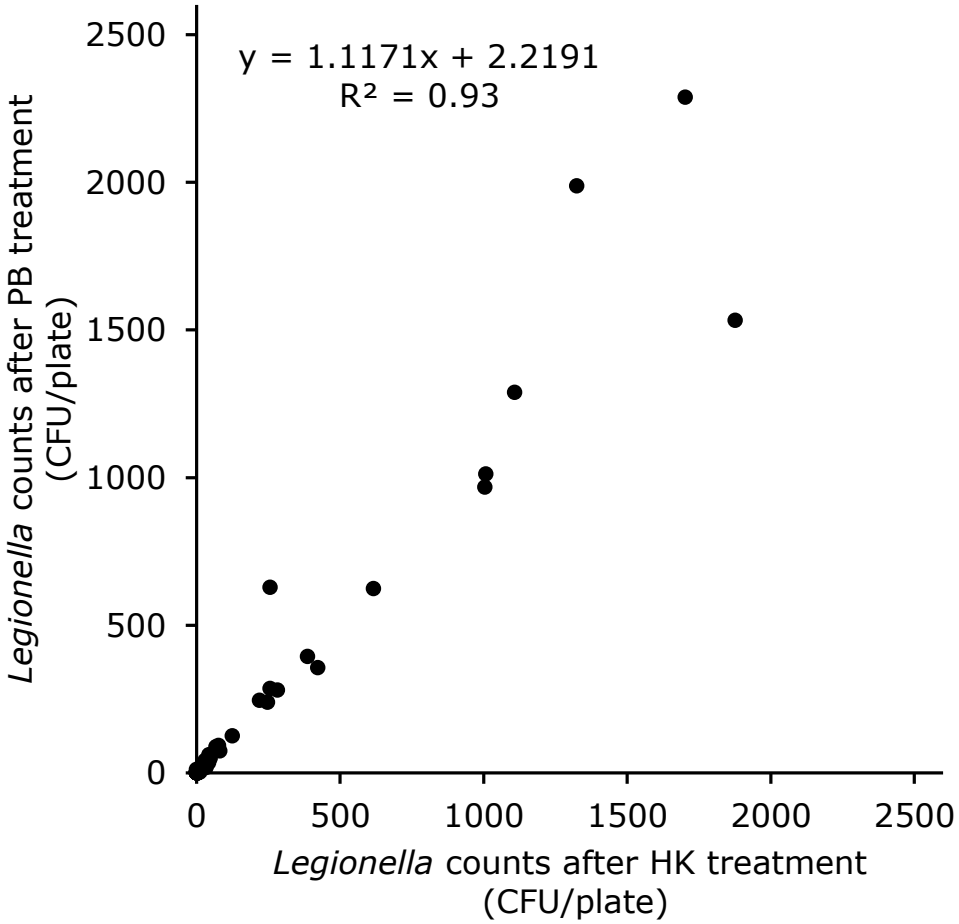

図 2-5　HCl-KCl 緩衝液（HK）と酸性リン酸緩衝液（PB）による前処理後のレジオネラ属菌数の比較（*n* = 63）

2.3 考察

一般的に，レジオネラ属菌培養検査時の酸処理にはHCl-KCl緩衝液が用いられるが，検査対象となる環境水の水質は様々で，中にはアルカリ度が高い試料も含まれる．そして水試料を遠心濃縮した後，遠心沈殿管内にいくらかの試料水は沈殿物とともに残存する．よって，沈殿物を脱イオン水で再懸濁する際に，アルカリ度が残ることが考えられる．もちろん，元の試料水のアルカリ度が高いほど残存するアルカリ度も多くなる．このようにアルカリ度が残存する試料を緩衝能の低いHCl-KCl緩衝液で酸処理しても期待通りにpHが低下せず，結果として酸処理の効果が得られないことがある．本章の検討では，酸性リン酸緩衝液とマッキルベイン緩衝液（クエン酸緩衝液）をレジオネラ属菌培養検査に用いる酸性緩衝液の候補として選び，前処理用の酸性緩衝液としての条件を満たすかどうか比較検討した．酸性リン酸緩衝液やマッキルベイン緩衝液の緩衝能はHCl-KCl緩衝液よりも高く，アルカリ度が高い試料水でもpHを低く保つことができた．表2-4と図2-1の結果は良く一致しており，アルカリ度が2000 mg/L未満では酸性リン酸緩衝液の方がpHを低下させる効果が高く，逆にアルカリ度が2000 mg/L以上だとマッキルベイン緩衝液の方がpHを低下させる効果が高いことを示している．また，図2-2の結果は酸性リン酸緩衝液の方がマッキルベイン緩衝液よりもBYEα液体培地の緩衝能で中和されやすいことを示しており，200 µlの酸性リン酸緩衝液を10 mlのBCYEα培地やGVPC培地に接種しても，培地のpHは6.8程度に保たれるだろう．Pine *et al.*（1979）はクエン酸が*L. pneumophila*の発育を強く阻害すると報告しており，一方リン酸は微生物に対する毒性が低いため（Stanier *et al*., 1986），生物学において緩衝液として多用される．したがって，レジオネラ属菌の培養検査の酸処理に用いる酸性緩衝液として，酸性リン酸緩衝液を選択することが最も適切だと判断した．

表2-5と図2-3の結果から，酸処理はレジオネラ属菌以外の細菌類や*P. aeruginosa*に対しても高い処理効果を示し，酸処理で低pHを保つ重要性が明らかとなった．

今回，真菌類に対する酸処理の効果については検討していない．なぜならば，真菌類は一般的に酸性条件に強いことが知られ，酸処理の効果は期待できないからである．レジオネラ属菌の培養検査時の真菌類汚染の抑制については今後の課題である．

本検討の結果は，酸性リン酸緩衝液はレジオネラ属菌の発育と検出を阻害することなく，HCl-KCl緩衝液よりも酸処理効果が高いことを示している．実際に，ある試料水ではHCl-KCl緩衝液で酸処理後のpHが5.8だったため，夾雑微生物の発育を抑制できずにレジオネラ属菌が検出不能となったが，同一試料水を酸性リン酸緩衝液で酸処理するとpHが2.4まで低下し，夾雑微生物の発育を強く抑制したことにより，652個のレジオネラ属菌のコロニーが培地上に発育した．

レジオネラ属菌培養検査のHCl-KCl緩衝液による酸処理はBopp *et al.*（1981）によって開発された大変優れた前処理方法であり，レジオネラ属菌検査の標準方法となっている．しかし，環境水のような様々な水質の試料水を扱う場合は，その試料水に応じた適切な前処理が重要である．

今回の結果から，環境水のレジオネラ属菌培養検査時の前処理に用いる酸性緩衝液として酸性リン酸緩衝液を使用することは，レジオネラ属菌培養検査の精度を向上させるために有効だと判断される．

第3章　レジオネラ属菌培養検査に用いる新規選択培地の開発

レジオネラ属菌の培養検査時の前処理に用いる酸性緩衝液として，一般的に用いられるHCl-KCl緩衝液の替わりに酸性リン酸緩衝液を使用することで，レジオネラ属菌以外の夾雑する細菌類を効果的に処理でき，検出不能となる割合を低減させたことについては第2章で述べたが，真菌類（特に糸状菌）の発育抑制は達成できていない．真菌類の抑制には選択培地に添加する抗真菌剤の工夫が有効と期待されるため，本章ではまず真菌の発育抑制能を高めたレジオネラ属菌検出用の選択培地（CATα培地）を開発した．そして，通常のレジオネラ属菌検査（酸処理後にGVPC培地に接種）において検出不能となった検体について，前処理を強化（熱処理と酸処理の組み合わせ）した検体をGVPC培地およびCATα培地に接種してレジオネラ属菌の検出（再検査）を試み，過去6年間の再検査結果を集計してCATα培地の有効性を評価した．

3.1　材料と方法

3.1.1　供試菌株および培養条件

レジオネラ属菌は *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 ATCC33152，*Legionella bozemanii* ATCC33217，*Legionella longbeachae* ATCC33462，*Legionella micdadei* ATCC33218，*Legionella gormanii* ATCC33297，*Legionella anisa* ATCC35292を使用した．これらはBCYEα培地を用いて37℃で培養した．冷却塔水から分離した10株の糸状菌（4株はポテトデキストロース寒天（PDA）培地で分離，6株はレジオネラ属菌検査時にGVPCα培地に発育した株を分離）はPDA培地を用いて27℃で培養した．これらの糸状菌はスライド培養にて胞子（分生子）を形成させて顕微鏡観察により属レベルまで同定した（Malloch, 1981）．

3.1.2　抗真菌剤およびレジオネラ属菌に対する抗菌活性の評価

シクロヘキシミド（和光純薬），アンホテリシンB（Sigma），グリセオフルビン（和光純薬），チアベンダゾール（Sigma）を選択培地に添加する抗真菌剤とした．これらはジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して用いた．レジオネラ属菌株はBYE液体培地を用いて37℃で一晩前培養した．500 µlの培養液を50 mlの新しいBYE液体培地に接種し（およそ10^6 cells/ml），培養液を調製した．各抗真菌剤のDMSO溶液（5 µl）を48穴マイクロプレートに添加し，調製したレジオネラ属菌の培養液を995 µlずつ加えて，37℃で3日間培養した．培養液の濁りを目視判定し，レジオネラ属菌の増殖が抑制された（培地が濁らない）最小の抗真菌剤濃度を最小発育阻止濃度（MIC）とした．

3.1.3　選択培地の調製

抗真菌剤を含まないGVPα培地(BCYEα寒天培地に3 g/Lのグリシン, 5 mg/Lのバンコマイシン, 100000 units/Lのポリミキシン Bを添加）を基礎培地として，5種類の培地を作製した．GVPCα培地（GVPα培地に80 mg/Lのシクロヘキシミドを添加），GVPAα培地（GVPα培地に80 mg/Lのアンホテリシン Bを添加），GVPGα培地（GVPα培地に80 mg/Lのグリセオフルビンを添加），GVPTα培地（GVPα培地に40 mg/Lのチアベンダゾールを添加）は糸状菌の発育抑制能評価に用いた．また，CATα培地（GVPα培地に80 mg/Lのシクロヘキシミド，80 mg/Lのアンホテリシン B，40 mg/Lのチアベンダゾールを添加，表 3-1）は抗真菌活性を増強したレジオネラ属菌検出用の選択培地として調製した.

3.1.4　選択培地の評価

10株の糸状菌の胞子を10 mlの滅菌脱イオン水に懸濁し，100 µlの胞子懸濁液を5種類の選択培地（GVPα培地，GVPCα培地，GVPAα培地，GVPGα培地，GVPTα培地）に接種して37℃で培養した．8日後に培地を観察して糸状菌の発育状況を観察した．次に，*L. pneumophila* ATCC33152株を滅菌脱イオン水に懸濁し，およそ10^2 CFU/mlの菌液を調製して，前述の糸状菌の胞子液と等量ずつ混合した．200 µlの混合液を4種類の選択培地（GVPCα培地，GVPAα培地，GVPTα培地，CATα培地）に接種して37℃で培養した．8日後に培地を観察して*L. pneumophila*のコロニー数および糸状菌の発育状況を観察した. 次に，レジオネラ属菌株を滅菌脱イオン水に懸濁し，およそ10^3 CFU/mlの菌液を調製した．100 µlの懸濁液を3種類の培地（BCYEα培地，GVPCα培地，CATα培地）に接種して37℃で培養した．8日後に培地を観察してレジオネラ属菌のコロニー数を測定した.

3.1.5　冷却塔水を用いたCATα培地の評価

日本各地のビルや工場の冷却塔から214検体の冷却塔水を採水した．採水には25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を1 ml添加し，高圧蒸気滅菌（121℃，20 min）した500 mlのポリプロピレン容器を用い，採水後は冷蔵保存して速やかに検査した．レジオネラ属菌の検査方法はISO 11731の検査方法に準じた．採水した冷却塔水を遠心濃縮（6400 × *g*, 30 min）で100倍に濃縮し，100倍濃縮試料に等量の0.2 M酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）を加え，室温で放置した．10 min後にCATα培地およびGVPC培地（MERCK）に200 µlずつ接種し，37℃のインキュベーター内で培養した．6日後，培地を観察してレジオネラ属菌が疑われる細菌コロニーを3個選び，L-システイン要求性確認試験として血液寒天培地（5%ウマ脱繊維血液添加普通寒天培地）およびBCYEα寒天培地に接種し，37℃のインキュベーター内で培養した．2日後，培地を観察して血液寒天培地に発育せずBCYEα培地に

発育したものをレジオネラ属菌と判定してレジオネラ属菌のコロニーを計数した.

3.1.6　冷却塔水，浴槽水のレジオネラ属菌検査およびCATα培地による再検査

2007年4月から2013年3月にかけて日本各地のビルや工場等の冷却塔から冷却塔水51184検体，温浴施設や宿泊施設，スポーツクラブ等から浴槽水53718検体を採水した．採水には25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を1 ml添加し，高圧蒸気滅菌（121℃，20 min）した500 mlのポリプロピレン容器を用い，採水後は冷蔵保存して速やかに検査した．レジオネラ属菌検査方法は 3.1.5 に従い，培養6日後の観察時にレジオネラ属菌以外の夾雑微生物が培地上を覆うように発育している培地は検出不能と判定し，検査を中止して再検査を実施した．再検査では検出不能率をより低下させるために熱処理と酸処理を組み合わせる前処理法（春日ら, 1999）を用いた．冷蔵保存しておいた100倍濃縮試料を熱処理（50℃，30 min）した後，等量の0.2 M酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）を加え，室温で放置した．10 min後にGVPC培地（MERCK）およびCATα培地に200 µlずつ接種し，37℃のインキュベーター内で培養した．6 日後，培地を観察してレジオネラ属菌が疑われる細菌コロニーを3個選び，L-システイン要求性確認試験を行い，レジオネラ属菌のコロニーを計数した.

表 3-1　CATα選択培地の組成

ACES [a]	10 g
KOH	3 g
yeast extract	10 g
α-ketoglutaric acid	1 g
glycine	3 g
activated charcoal	2 g
agar	15 g
L-cysteine·hydrochloride [b]	400 mg
ferric pyrophosphate [b]	250 mg
vancomycin [b]	5 mg
polymyxin B [b]	100000 units
cycloheximide [b]	80 mg
amphotericin B [b]	80 mg
thiabendazole [b]	40 mg
deionized water	up to 1000 ml
pH 6.9 ± 0.1	

[a] N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid

[b] Aseptically added after autoclaved.

3.2 結果

3.2.1 レジオネラ属菌に対する抗真菌剤の影響

Legionella pneumophila ATCC33152, *L. bozemanii* ATCC33217, *L. longbeachae* ATCC33462, *L. micdadei* ATCC33218, *L. gormanii* ATCC 33297, *L. anisa* ATCC35292 に対するシクロヘキシミド，アンホテリシン B，グリセオフルビン，チアベンダゾールの抗菌活性を評価したところ，チアベンダゾールはレジオネラ属菌に対し弱い活性（MIC が 100 から 200 μg/ml）を示したが，100 μg/ml 未満ではレジオネラ属菌に対し抗菌活性を示さなかった．一方，シクロヘキシミド，アンホテリシン B，グリセオフルビンは 400 μg/ml 添加してもレジオネラ属菌に対して抗菌活性を示さなかった．

3.2.2 糸状菌に対する抗真菌剤の効果

5 種類の選択培地を用いて糸状菌に対する抗真菌剤の効果を評価したところ（表 3-2），GVPα培地（抗真菌剤を含まない）と GVPGα培地（グリセオフルビンを含む）には 10 株の糸状菌すべてが培地一面に発育した．GVPCα培地（シクロヘキシミドを含む）は 2 株しか糸状菌を抑制できなかったが，M5 から M10 の糸状菌は，冷却塔水から GVPCα培地で分離された株（シクロヘキシミド耐性株）であり，シクロヘキシミドの効果が見られなかった．一方，GVPAα培地（アンホテリシン B を含む）は 5 株の糸状菌の発育を完全に抑制し，GVPTα培地（チアベンダゾールを含む）は 3 株の糸状菌の発育を完全に抑制した．表 3-2 の結果から，アンホテリシン B とチアベンダゾールは異なる抗真菌スペクトルを示すことが明らかとなった．

3.2.3 *L. pneumophila* の検出に及ぼす CATα培地の影響

これまでの結果から，シクロヘキシミド，アンホテリシン B，チアベンダゾールを組み合わせた選択培地は真菌抑制効果が上昇すると期待されたため，これらの抗真菌剤を含む CATα培地を調製した．表 3-3 は 4 種類の選択培地を用いた *L. pneumophila* の検出結果を示す．CATα培地は 10 株すべての糸状菌の発育を完全に抑制し，*L. pneumophila* を検出できた．一方，GVPCαは 7 株，GVPAαは 2 株，GVPTαは 6 株の糸状菌が発育し，*L. pneumophila* の検出が妨げられた．*Fusarium* sp. M5 株に対する各培地の発育抑制能を図 3-1 に示す．このように，シクロヘキシミド，アンホテリシン B，チアベンダゾールの組み合わせは糸状菌に対し相乗効果を示すことが示された．次に，CATα培地でのレジオネラ属菌の発育を調べた．表 3-4 は BCYEα培地，GVPCα培地，および CATα培地に発育したレジオネラ属菌のコロニー数の比較を示す．GVPCα培地と CATα培地でレジオネラ属菌の発育に違いは認められなかった．

3.2.4　CATα培地を用いたレジオネラ属菌の検出

CATα培地は糸状菌の発育抑制に優れ，レジオネラ属菌の発育に影響がないことが，表 3-3 および 3-4 の結果からわかる．よって，CATα培地の有効性を GVPCα培地と比較することで評価した．GVPCα培地と CATα培地の糸状菌汚染状況を比較したところ，214 検体の冷却塔水試料のうち，GVPCα培地は 29 試料（13.6%）が糸状菌に汚染されたが，CATα培地は糸状菌に汚染されたのは 4 試料（1.9%）だった．図 3-2 は 214 検体の冷却塔水のうち，いずれかの培地でレジオネラ属菌が検出された 52 検体（検出不能となった検体は除外）について，培地上に発育したレジオネラ属菌のコロニー数を散布図で示した．この結果，GVPCα培地と CATα培地に発育したレジオネラ属菌数には相関（$R^2 = 0.74$）が見られた．

3.2.5　レジオネラ属菌の再検査における CATα培地の有効性

冷却塔水 51184 検体，浴槽水 53718 検体の培養法によるレジオネラ属菌検査結果を表 3-5 に示す．冷却塔水のレジオネラ属菌の検出不能検体数は 3337 検体（6.5%），浴槽水のレジオネラ属菌の検出不能検体数は 520 検体（1.0%）だった．表 3-6 は冷却塔水および浴槽水のレジオネラ属菌検査において検出不能となった検体の再検査結果を示す．GVPC 培地と CATα培地で検出したレジオネラ属菌の菌数分布を比較したところ，冷却塔水，浴槽水ともに両培地の菌数分布は同等であった．全検体に対する検出不能率を培養法による通常検査，再検査で比較ところ，冷却塔水では CATα培地の使用で検出不能率が 6.5%から 0.2%に約 30 分の 1 以下に低減し，浴槽水では CATα培地の使用で検出不能率が 1.0%から 0.1%に約 10 分の 1 に低減した．

表 3-2　各種選択培地の抗真菌効果

Strain	Growth on [a]				
	GVPα	GVPCα	GVPAα	GVPGα	GVPTα
Penicillium sp. M1	++	++	−	++	++
Trichoderma sp. M2	++	−	+	++	−
Aspergillus sp. M3	++	−	−	++	++
Penicillium sp. M4	++	++	+	++	−
Fusarium sp. M5	++	++	++	++	+
Aspergillus sp. M6	++	++	+	++	++
Aspergillus sp. M7	++	++	−	++	++
Aspergillus sp. M8	++	++	−	++	++
Penicillium sp. M9	++	++	−	++	++
Penicillium sp. M10	++	++	++	++	−

[a] ++, Growth; +, growth inhibition; −, no growth

表 3-3　各種選択培地による *L. pneumophila* の検出

Strain	CFU of *L. pneumophila* per plate on			
	GVPCα	GVPAα	GVPTα	CATα
Penicillium sp. M1	23	42	OG	52
Trichoderma sp. M2	42	26	39	35
Aspergillus sp. M3	19	26	OG	41
Penicillium sp. M4	OG [a]	15	18	16
Fusarium sp. M5	6	OG	12	44
Aspergillus sp. M6	4	17	OG	39
Aspergillus sp. M7	OG	22	OG	22
Aspergillus sp. M8	OG	20	OG	31
Penicillium sp. M9	OG	32	OG	35
Penicillium sp. M10	OG	OG	35	30

[a] Overgrowth of the molds

表 3-4　BCYEα, GVPCαおよび CATα培地によるレジオネラ属菌の発育能比較

Strain	Initial cell counts (CFU/ml)	% Recovery of *Legionella* cells on [a]		
		BCYEα	GVPCα	CATα
L. pneumophila ATCC33152	2×10^3	100	74	78
L. bozemanii ATCC33217	1×10^3	100	10	14
L. longbeachae ATCC33462	3×10^3	100	85	83
L. micdadei ATCC33218	6×10^3	100	71	83
L. gormanii ATCC33297	4×10^3	100	4	3
L. anisa ATCC35292	2×10^2	100	40	44

[a] The value shows the percentage of CFU of *Legionella* (two replicate plates) when the CFU on BCYEα were 100%.

表 3-5　培養法によるレジオネラ属菌検出結果

Legionella counts (CFU/100 ml)	Number of samples				Total	
	Cooling tower water		Bath water			
< 10	37012	(72.3%)	46491	(86.5%)	83503	(79.6%)
10-90	4413	(8.6%)	4587	(8.5%)	9000	(8.6%)
100-990	3206	(6.3%)	1451	(2.7%)	4657	(4.4%)
1000-9900	2340	(4.6%)	559	(1.0%)	2899	(2.8%)
> 10000	876	(1.7%)	110	(0.2%)	986	(0.9%)
Unknown [a]	3337	(6.5%)	520	(1.0%)	3857	(3.7%)
Total	51184		53718		104902	

[a] "Unknown" indicates that the presence of *Legionella* is unknown due to the overgrowth of non-target microorganisms.

表 3-6　冷却塔水および浴槽水の再検査結果

Legionella counts (CFU/100 ml)	Number of samples							
	Cooling tower water				Bath water			
	GVPC		CATα		GVPC		CATα	
< 10	1532	(45.9%)	2358	(70.7%)	230	(44.2%)	349	(67.1%)
10-90	298	(8.9%)	382	(11.4%)	37	(7.1%)	77	(14.8%)
100-990	177	(5.3%)	258	(7.7%)	14	(2.7%)	27	(5.2%)
1000-9900	123	(3.7%)	155	(4.6%)	9	(1.7%)	11	(2.1%)
> 10000	63	(1.9%)	88	(2.6%)	7	(1.3%)	6	(1.2%)
Unknown [a]	1144	(34.3%)	96	(2.9%)	223	(42.9%)	50	(9.6%)
Total	3337		3337		520		520	

[a] "Unknown" indicates that the presence of *Legionella* is unknown due to the overgrowth of non-target microorganisms.

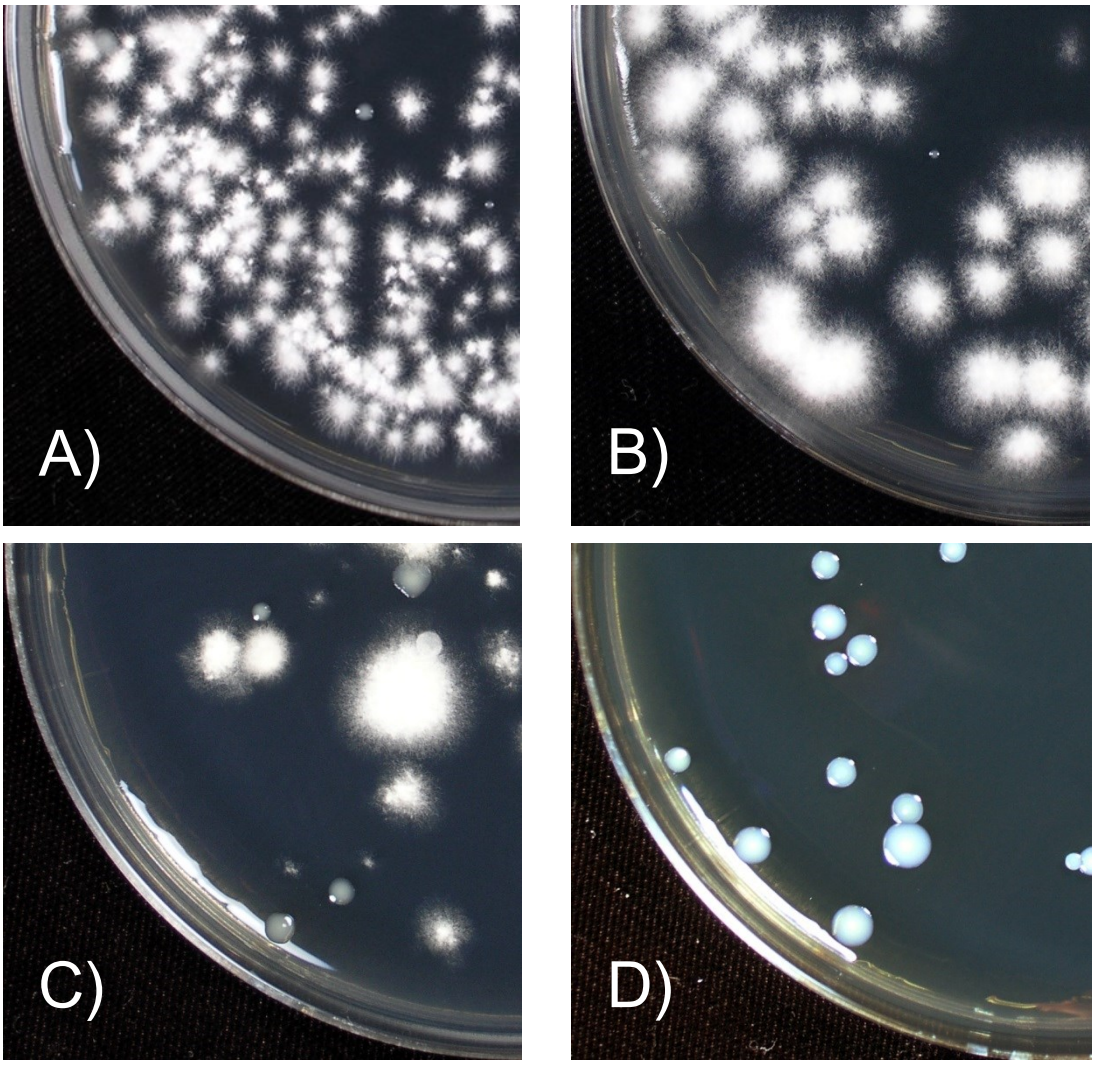

図 3-1　糸状菌（*Fusarium* sp. M5）に対する各種選択培地の発育抑制能.

写真は *Fusarium* sp. M5 と *L. pneumophila* ATCC33152 を混合して 37℃で 8 日間培養後の状況を示す.

A) GVPCα, containing 80 μg/ml of cycloheximide

B) GVPAα, containing 80 μg/ml of amphotericin B

C) GVPTα, containing 40 μg/ml of thiabendazole

D) CATα, containing 80 μg/ml of cycloheximide, 80 μg/ml of amphotericin B, and 40 μg/ml of thiabendazole

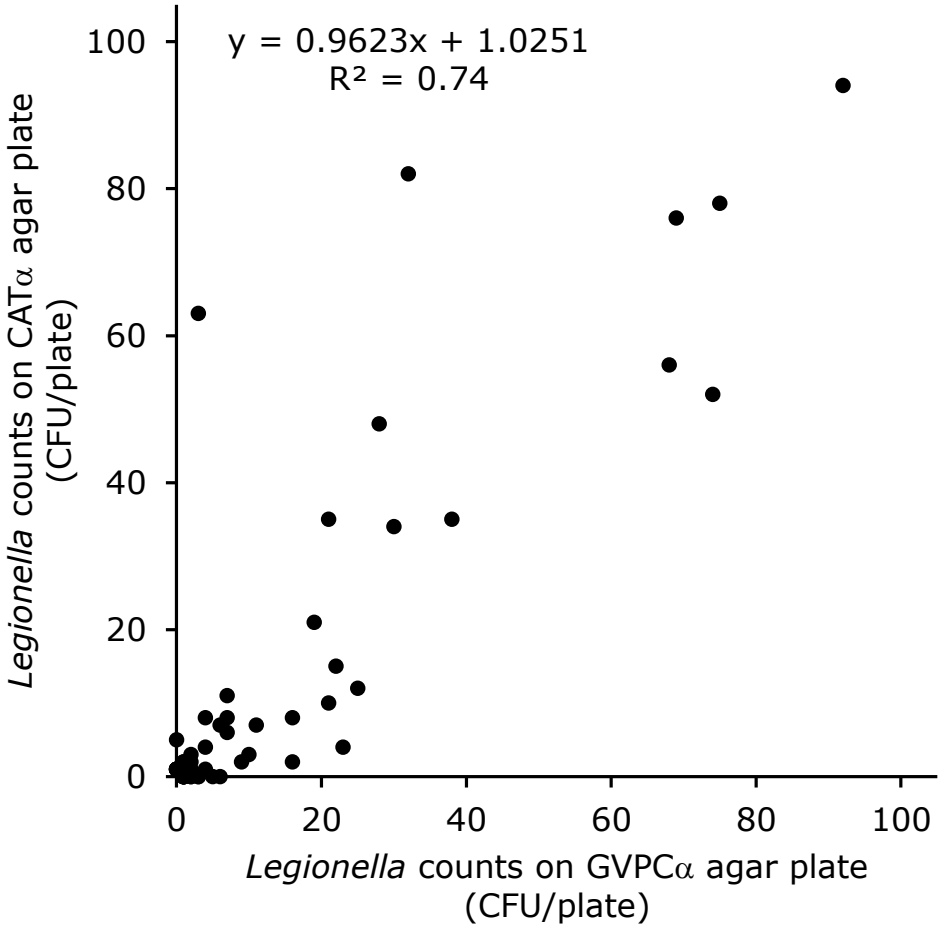

図 3-2　GVPCαおよび CATα選択培地で検出したレジオネラ属菌数の比較（*n* = 52）.

3.3 考察

レジオネラ属菌の培養検査において，選択培地の糸状菌汚染はレジオネラ属菌の検出を妨げる．また，ある種類の糸状菌は培地上で抗生物質を産生するため，それがレジオネラ属菌の発育を阻害することもある．したがって，レジオネラ属菌用の選択培地には抗真菌剤を添加し，糸状菌の発育を抑制することが必要である．Lin *et al.*（1999）は酵母の発育を抑制するためにレジオネラ属菌の選択培地にフルコナゾールを添加した．春日ら（2002）はレジオネラ属菌の選択培地である MWY 培地にアンホテリシン B を添加することの有効性を報告している．本章ではレジオネラ属菌の選択培地に添加する抗真菌剤としてチアベンダゾールが有効であり，シクロヘキシミド，アンホテリシン B，チアベンダゾールを組み合わせた CATα培地の有効性を示した．別の実験で，GVPCα培地のシクロヘキシミド濃度を上げて糸状菌の発育抑制能を検証したが, 200 μg/ml のシクロヘキシミドを添加した培地でも糸状菌の発育を抑制できなかった．ゆえに，いくつかの抗真菌スペクトルの異なる抗真菌剤を組み合わせることが効果的だと考える．

シクロヘキシミドとアンホテリシン B は細菌類に対して抗菌活性を示さないことが知られている．シクロヘキシミドはグルタルイミド系の抗生物質で真核生物のタンパク質合成を選択的に阻害する．また，アンホテリシン B はポリエンマクロライド系の抗生物質で細胞膜のエルゴステロールに作用し，カリウムイオン等の透過性障害を引き起こす．Allen and Gottlieb（1970）は，チアベンダゾールはミトコンドリアの電子伝達系を阻害すると報告している．したがって，これらの抗真菌剤は糸状菌に対して高い選択毒性を示すと考えられる．

表 3-4 の結果は GVPCα培地と CATα培地のレジオネラ属菌のコロニー形成率が BCYEα培地よりも低いことを示しているが，これらの結果は奥田ら（1984）の報告と一致しており，培地に添加するバンコマイシンとポリミキシン B の影響により，レジオネラ属菌の発育が妨げられているかもしれない．環境水のようにレジオネラ属菌以外の細菌類を多く含む試料からレジオネラ属菌を検出する場合，レジオネラ属菌の発育支持能とレジオネラ属菌以外の細菌の発育抑制能の両方を併せ持つ必要があり，それらのバランスが重要となる．今回，CATα培地にチアベンダゾールを 40 μg/ml 添加したが，レジオネラ属菌に対する抗菌活性を考慮すると，添加量を 60 μg/ml 程度まで増やしてもレジオネラ属菌の発育には影響がないかもしれない．しかし，表 3-3 の結果は 40 μg/ml のチアベンダゾールの添加で十分に糸状菌の発育を抑制したことを示している．

冷却塔水と浴槽水のレジオネラ属菌再検査の結果から，CATα培地は GVPC 培地よりも検出不能率の低減効果に優れることが明らかとなった．CATα培地は GVPC 培地と比較して抗生物質の添加量が多い（バンコマイシンの添加量は GVPC 培地が 1 mg/L，CATα培地が 5 mg/L，ポリミキシン B の添加量は GVPC 培地が 80000 units/L，CATα培地が 100000 units/L）ため夾雑微生物の抑制能が高いが，レジオネラ属菌の検出に影響がないことを確認するため両培地で検出したレジオネラ属菌数を比較した．再検査を実施した 3857 検体（冷却塔水 3337 検体，浴槽水 520 検体）のうち，GVPC

培地とCATα培地の両方ともレジオネラ属菌が不検出だった1665検体（冷却塔水1459検体，浴槽水206検体）と，いずれかの培地で検出不能だった1381検体（冷却塔水1155検体，浴槽水226検体）を除き，培地に発育したレジオネラ属菌のコロニー数（$n = 811$）をプロットした（図3-3）．両培地で検出したレジオネラ属菌数は概ね相関することが読み取れ，CATα培地の使用でレジオネラ属菌の発育が著しく阻害されることはないと考えられる．

本章では3種類の作用機作の異なる抗真菌剤を組み合わせてレジオネラ属菌の選択培地に添加することにより，培地の糸状菌汚染が減少して効果的にレジオネラ属菌を検出できることを示し，その結果をもとにレジオネラ属菌の選択培地としてCATα培地を開発した．また，実際の環境水からのレジオネラ属菌の培養検査において，CATα培地の使用によりレジオネラ属菌以外の夾雑微生物汚染を大幅に抑え，検出不能率を減少させることができた．レジオネラ属菌の培養検査にCATα培地を使用することで，レジオネラ属菌を効率良く検出できると期待される．

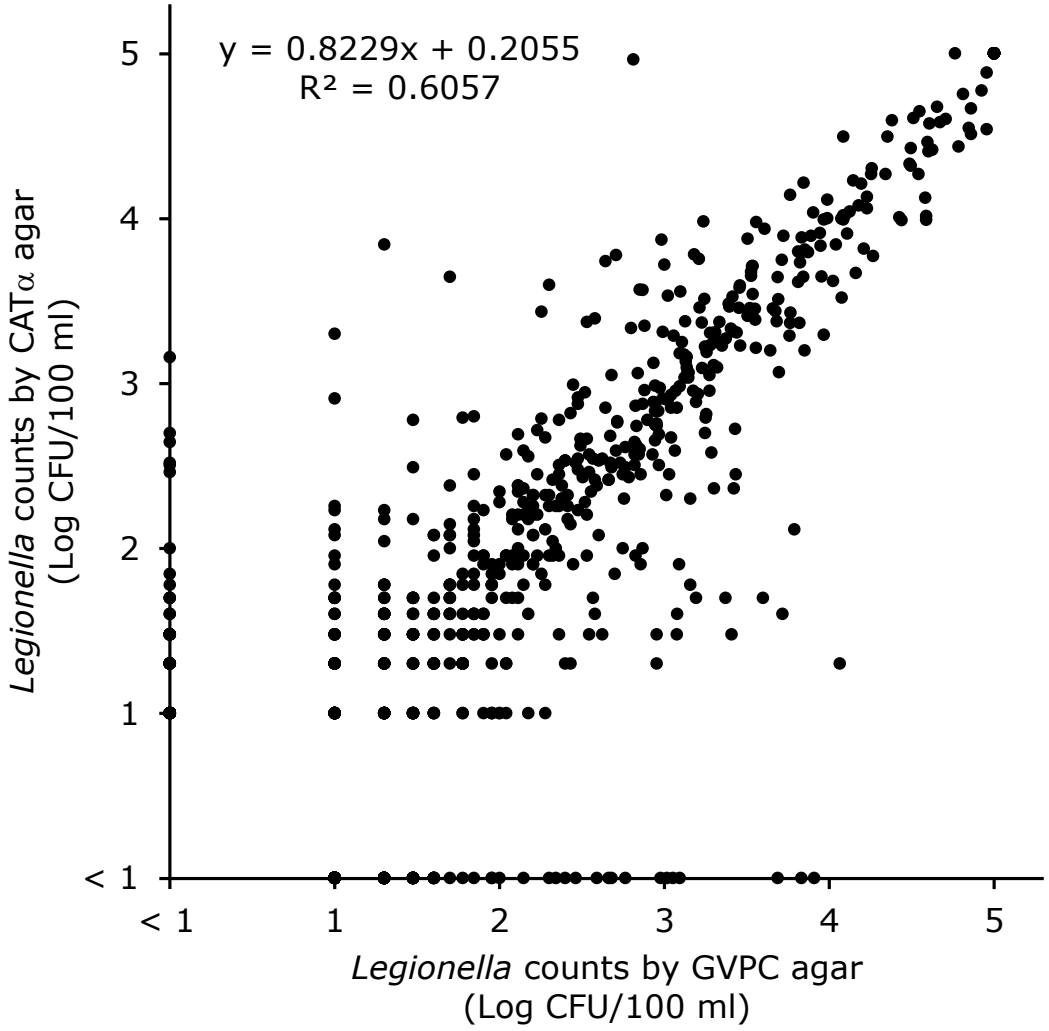

図 3-3　GVPC および CATα選択培地を用いた再検査において検出したレジオネラ属菌数の比較（*n* = 811）.

第 3 部　遺伝子検出法によるレジオネラ属菌検査の迅速化および高精度化

第 4 章　PCR 法および LAMP 法による浴槽水からのレジオネラ属菌検出に関する検討

レジオネラ属菌は培地上での増殖速度が遅く，その培養検査には 1 週間以上を要するため迅速な検査方法の採用が望まれる．遺伝子増幅法である PCR 法でレジオネラ属菌の遺伝子を増幅・検出すれば，数時間のうちにレジオネラ属菌の遺伝子の有無を判定できる．しかし，PCR 法はレジオネラ属菌の遺伝子を検出するため，レジオネラ属菌の死菌であっても遺伝子さえ残っていれば検出する．そのため，環境水検査において PCR 法は培養法よりも陽性率が高い傾向にある（Ng *et al*., 1997）．

レジオネラ属菌は遊離残留塩素濃度 0.4 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム水溶液中では 15 分以内で生菌が検出されなくなることから（薮内ら, 1995a），浴槽水を適切な濃度の塩素剤で殺菌処理した場合にも，浴槽水中のレジオネラ属菌が死滅して培養法で不検出になると考えられる．このとき PCR 法によって検査する場合の塩素剤による核酸の分解性が注目される．DNA 試料を 0.55%（v/v）次亜塩素酸ナトリウム水溶液での 5 分間処理（Prince and Andrus, 1992）や，100 mg/L の次亜塩素酸系殺菌剤で *L. pneumophila* を 15 分間処理すると PCR で検出されなくなった（Bej *et al*., 1991）という報告があるが，これらの実験では高濃度の塩素が用いられており，実際の浴槽水の環境とは大きく異なる．また，冷却塔水を各種殺菌剤で処理したときのレジオネラ属菌に対する殺菌効果は十分認められているが，核酸の分解効果については検討されていない．そこで，塩素等を浴槽水や冷却塔水で使用した場合に，レジオネラ属菌の PCR 法による検査結果に与える影響を調査した．

また，比較的新しい遺伝子増幅法である Loop-mediated isothermal amplification（LAMP）法は，レジオネラ属菌の検出に関する検討も進んでおり（安中, 2003; 安中ら, 2003; 安中ら, 2004），PCR 法よりも操作が簡便で，迅速性，精確性が PCR 法より優れるとされる（表 4-1）．そこで，浴槽水のレジオネラ属菌検査を PCR 法，LAMP 法で行い，培養法の検査結果と比較することで，遺伝子検出法の実用性を評価した．さらに，LAMP 法と培養法による浴槽水のレジオネラ属菌検査結果を多検体で比較して，LAMP 法の有用性について解析した．

表 4-1　LAMP 法および PCR 法の比較

Parameter	LAMP method	PCR method
Polymerase	*Bst* DNA polymerase	*Taq* DNA polymerase
Primers	Four primers	Two primers
Reaction temperature	Isothermal	Three steps
Reaction time	Within 1 h	About 2 h
Detection method	Turbidity	Gel electrophoresis

4.1 材料と方法

4.1.1 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いた試験

5 リットルの三角フラスコ 3 本に，一晩放置し脱塩素した水道水（つくば市水，pH 7.4）を 5 リットルずつ入れ，*Legionella pneumophila* ATCC33152 株をおよそ 10^7 CFU/100 ml となるように添加して試験水とした．試験水に 12%次亜塩素酸ナトリウム溶液（キシダ化学）を添加し，それぞれの試験水中の遊離残留塩素濃度を 10, 1 および 0.2 mg/L に調製した. 室温で撹拌しながら 10, 30, 60, 120, 180，360，720 および 1440 分後に 500 ml ずつ容器（あらかじめチオ硫酸ナトリウムを添加して高圧蒸気滅菌したポリプロピレン製の 500 ml ビン）に採水した．このとき，適宜それぞれの遊離残留塩素濃度を DPD 法（笠原理化）で測定し，必要に応じて次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し，所定の遊離残留塩素濃度を維持した.

4.1.2 各種殺菌剤を用いた試験

塩素以外の殺菌剤として，31%過酸化水素水（三菱瓦斯化学），50%グルタルアルデヒド水溶液（キシダ化学），CMI（5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン）10%製剤（ケミクレア）および BNPD（2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオール）（ケイ・アイ化成）を用いて試験した．1 リットルのポリプロピレン製容器に，一晩放置し脱塩素した水道水を 1 リットルずつ（過酸化水素の試験を行うものは 950 ml）加えて，*L. pneumophila* ATCC33152 株をおよそ 10^7 CFU/100 ml となるようにそれぞれ調製し試験水とした．それに，31%過酸化水素水を 50 g（過酸化水素濃度は 15500 mg/L），50%グルタルアルデヒド水溶液を 40 mg（グルタルアルデヒド濃度は 20 mg/L），CMI 10%製剤を 20 mg（CMI 濃度は 2 mg/L），BNPD を 10 mg（BNPD 濃度は 10 mg/L）それぞれに添加した．これらを室温で放置し，24 時間後および 48 時間後に，滅菌済みの 500 ml のポリプロピレン製容器に 500 ml ずつ採水した.

4.1.3 試料水の濃縮および培養法，PCR 法による *L. pneumophila* の検出

採水した 500 ml 全量をセルロースアセテート製のメンブレンフィルター（孔径 0.45 μm, 47 mm, アドバンテック）で吸引ろ過し，続けて 50 ml の滅菌脱イオン水をろ過してメンブレンフィルターをすすいだ．ろ過したメンブレンフィルターを 50 ml のスクリューキャップ付き遠心沈殿管に入れて，滅菌脱イオン水を 5 ml 添加し，ボルテックスタイプミキサーで 5 分間撹拌してフィルター捕捉物を再懸濁させた．再懸濁液は滅菌試験管に 1 ml，マイクロチューブに 2 ml 分注し，それぞれ培養法による生菌数測定および PCR 法による検出に用いた.

滅菌試験管に分注した100倍濃縮液100 µlを前処理せずにGVPC培地（Dennis *et al*., 1984a）に接種し，37℃で6日間培養してGVPC培地上に形成した*L. pneumophila*のコロニーを計数した．

DNAの抽出はBeige *et al*.（1995）の結核菌からのDNA抽出方法を参考にした．2 mlの100倍濃縮液を遠心し（14000 × *g*，10 min，4℃），上清を1960 µl除去して50 mM水酸化ナトリウム溶液を50 µl添加した．ボルテックスタイプミキサーで撹拌後，沸騰水（100℃）に浸けて15 min煮沸，直ちに沸騰水中からチューブを取り出し氷冷後，8 µlの1 M Tris-HCl緩衝液（pH 7）を添加して中和した．再度遠心し（14000 × *g*，10 min，4℃）上清をDNA溶液とした．

PCRの反応液はTaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version（タカラバイオ）を用いて調製した．反応液1本あたり，33.75 µlの滅菌超純水，5 µlの10 × Ex Taq buffer，4 µlのdNTPs（各2.5 mM），1 µlのForward primer（10 µM，LEG-448-A，5’-GAG GGT TGA TAG GTT AAG AGC-3’, Yamamoto *et al*., 1993），1 µlのReverse primer（10 µM，LEG-854-B，5’-CGG TCA ACT TAT CGC GTT TGC T-3’, Yamamoto *et al*., 1993），0.25 µlのEx Taq polymerase（5 U/µl）を混合し，DNA溶液を5 µl添加して全量を50 µlとした．反応液はサーマルサイクラー（GeneAmp 9700，Applied Biosystems）を用いて増幅反応を行った．反応条件は95℃で30 s，65℃で30 s，72℃で60 sを40サイクルとした．増幅産物はアガロースゲル（1.5%）で電気泳動して，泳動後のゲルをSYBR Green I（BMP）で染色し，254 nmのトランスイルミネーター上でレジオネラ属菌由来の430 bpの増幅産物を観察することで検出した．

4.1.4　浴槽水の検査試料

浴槽水は2003年7月から9月にかけて全国のホテル・旅館，公衆浴場，リゾート施設，企業の寮・保養所，老人福祉施設などの100箇所の浴槽から採取した．100検体の浴槽水の内訳は，原水として温泉水を使用しているものが49検体，水道水や井戸水を使用しているものが51検体であった．また，2004年6月から2012年4月にかけて全国のホテル・旅館，公衆浴場，リゾート施設，企業の寮・保養所，老人福祉施設，スポーツクラブなどから2393検体の浴槽水を採取した．採水には25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を1 ml添加し，高圧蒸気滅菌した500 mlのポリプロピレン製容器を用いた．採取後の試料水は冷蔵保存し，速やかに検査した．

4.1.5　培養法およびPCR法，LAMP法によるレジオネラ属菌の検出

試料水の濃縮は4.1.3に従った．滅菌小試験管に分注した1 mlの100倍濃縮液に1 mlの0.2 M酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）を加え，撹拌して室温に10 min放置後，200 µlをGVPC培地に接種して37℃のインキュベーターで培養した．6日後，GVPC培地を観察してレジオネラ属菌の特徴を持つ細菌コロニーを数え，それらのコロニーのうち最低3個を選び血液寒天培地（5%ウマ脱繊維血液添加普通寒天培地）およびBCYEα培地に接種し，37℃のインキュベーターで培養した．2日後それぞ

れの培地を観察し，血液寒天培地に発育せず BCYEα培地に発育したコロニーをレジオネラ属菌として計数した.

DNA の抽出および PCR 法による検出方法は 4.1.3 に従った．LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出は，レジオネラ属菌検出用 LAMP 法試薬（栄研化学，現在市販されている Loopamp® レジオネラ検出試薬キット *E* と同等品）を用いた. キット添付の反応液 20 µl（*Bst* DNA polymerase を含む）に DNA 抽出液を 5 µl 加えて，全量 25 µl の反応液を調製した．反応液は Loopamp® リアルタイム濁度測定装置（テラメックス）を用い，65℃で 60 min 増幅反応を行った．60 min 以内に LAMP 反応に伴う特徴的な濁度上昇が見られた検体をレジオネラ属菌陽性と判定した.

4.1.6　DNA の精製

PCR 阻害物質の存在が疑われた検体については DNA を精製した．1.5 ml のマイクロチューブに 50 µl の DNA 溶液を採り，5 µl の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液，125 µl のエタノール（キシダ化学）および 2 µl の Pellet Paint (Novagen) を加え, ボルテックスタイプミキサーで撹拌した. 室温で 10 min 放置後，遠心して（14000 × *g*，10 min，4℃）上清を注意深くマイクロピペットで除き，70%エタノール水溶液を 500 µl 加えてボルテックスタイプミキサーで撹拌した．同様に遠心して上清を注意深くマイクロピペットで除き，マイクロチューブのキャップを開けた状態でクリーンベンチ内に放置し，残留するエタノールを除去した後，25 µl の TE 緩衝液（10 mM Tris-HCl，1 mM EDTA，pH 8.0）に溶解させ精製 DNA 溶液とした.

4.1.7　温泉水に含まれる懸濁物質の元素分析

培養法で多数のレジオネラ属菌が検出されたにもかかわらず，PCR 法で陰性となった検体のひとつ（温泉水）に含まれる懸濁物質の成分を調査した．試料水を遠心して（14000 × *g*，10 min，4℃）上清をマイクロピペットで除いて沈殿物を得た．それを，エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置（EDX-800，島津製作所）を用いて元素分析した.

4.2　結果

4.2.1　塩素による *L. pneumophila* の DNA の分解

塩素を添加したときの *L. pneumophila* の検出結果を表 4-2，PCR 検出時の電気泳動写真を図 4-1 に示す．培養法の結果は遊離残留塩素濃度 0.2 mg/L，接触時間 10 min を始めとし，全ての検体で生菌は不検出であった．PCR 法の結果では，遊離残留塩素濃度 10 mg/L の場合 30 min 接触すると *L.*

pneumophila は検出されなくなった．また，遊離残留塩素濃度 1 mg/L の場合は 2 時間後には検出されなくなり，さらに遊離残留塩素濃度が 0.2 mg/L という低濃度でも 24 時間後には検出されなくなった．

4.2.2　塩素以外の殺菌剤による *L. pneumophila* の DNA の分解

塩素以外の殺菌剤による試験結果を表 4-3，PCR 検出時の電気泳動写真を図 4-2 に示す．培養法の結果は 24 時間後では BNPD が 60 CFU/100 ml 検出された以外すべての検体で不検出，48 時間後では全ての殺菌剤で不検出であった．PCR 法の結果では過酸化水素の場合 24 時間後には *L. pneumophila* は検出されなくなった．したがって，過酸化水素も塩素同様に DNA の分解作用を持つことが示された．過酸化水素以外の殺菌剤（グルタルアルデヒド，CMI，BNPD）では培養法で生菌がすべて不検出となった 48 時間後でも PCR 法で *L. pneumophila* が検出された．このときの PCR 法による DNA の増幅量は無処理時と同等であり，これらの殺菌剤で 48 時間処理しても，DNA はほとんど分解されないことが明らかとなった．

4.2.3　浴槽水から培養法によるレジオネラ属菌検出結果

温泉浴槽水と水道水または井戸水の浴槽水から検出されたレジオネラ属菌数別検体数を表 4-4 に示すが，両者の間で顕著な差は認められなかった．浴槽水 100 検体のうち，不検出（10 CFU/100 ml 未満）は約半分の 51 検体であった．なお，レジオネラ属菌以外の細菌類や真菌類に GVPC 培地が覆われる「検出不能」となった検体は存在しなかった．

4.2.4　浴槽水から LAMP 法および PCR 法によるレジオネラ属菌検出結果

浴槽水 100 検体について，LAMP 法および PCR 法によってレジオネラ属菌を検出した結果を，培養法の菌数分布とともに表 4-5 に示す．培養法で不検出の 51 検体のうち，LAMP 法では 22 検体が陽性と判定され，PCR 法では 20 検体が陽性と判定された．また，培養法で 10 から 90 CFU/100 ml のレジオネラ属菌が検出された 24 検体については，LAMP 法では全て陽性と判定しており，PCR 法では 21 検体を陽性と判定し 3 検体を陰性と判定した．また，培養法で 100 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された 25 検体では，LAMP 法は全て陽性，PCR 法では 24 検体が陽性で 1 検体が陰性であった．培養法陽性の検体で PCR 法陰性の 4 検体は全て温泉浴槽水だった．これら 4 検体については PCR 阻害物質の存在が疑われたため，抽出した DNA を精製して再度 PCR 法による検出を試みた．その結果，4 検体中 1 検体が陽性に転じた．この検体の培養法でのレジオネラ属菌数

は 8800 CFU/100 ml であり，茶褐色の沈殿物を多量に含んでいた．DNA 精製後も PCR 法で陰性と判定した 3 検体の培養法でのレジオネラ属菌数はそれぞれ 10, 20, および 60 CFU/100 ml であった.

4.2.5　温泉水中の懸濁物質の成分

蛍光 X 線分析装置による温泉水中の懸濁物質の元素分析結果を表 4-6 に示す．成分比率はナトリウム以上の検出した元素の重量比率である．鉄が 56%と最も多く検出し，次にケイ素が検出した．他に硫黄，亜鉛，カルシウムも僅かながら検出した.

4.2.6　浴槽水から LAMP 法および培養法によるレジオネラ属菌検出結果

浴槽水 2393 検体からの LAMP 法および培養法によるレジオネラ属菌検出結果を表 4-7 に示す．LAMP 法の陽性率は 43.5%，培養法の陽性率は 13.4%，LAMP 法の結果と培養法の結果の一致率は 67.4%だった．LAMP 法陰性で培養法陽性となった不一致は 29 検体存在した．そのうちの 9 検体は同一施設の検体だったため，培養法で得られたレジオネラ属菌を分離・培養して LAMP 法での増幅を検証した結果，反応液あたり 10^3 個の菌体由来の DNA を添加しても LAMP の増幅が認められなかった．そこで，本菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分配列（1477 bp）を解析し，GenBank/DDBJ/EMBL のデータベースに登録された塩基配列から BLAST 検索により相同な配列を検索した．その結果，本菌株（*Legionella* sp. L-47，アクセッションナンバーは AB899895）とレジオネラ属菌の既存種に相同性は認められなかった（一致率は 95%以下）.

4.2.7　浴槽設備の化学的殺菌洗浄結果

レジオネラ属菌が検出されたため浴槽設備の化学的殺菌洗浄を実施した 6 系統について，その洗浄前後で採水して LAMP 法および培養法で洗浄効果を評価した結果を表 4-8 に示す．化学的殺菌洗浄の条件は，次亜塩素酸ナトリウムを用いて遊離残留塩素濃度 500 mg/L 以上で 1 時間以上，浴槽設備の水系内を循環させることを原則としているため，洗浄後の検体からは培養法でレジオネラ属菌は検出されなかったが，LAMP 法では 1 検体がレジオネラ属菌陽性であった.

表 4-2　PCR 法と培養法によるレジオネラ属菌検出に対する遊離塩素の影響

	Concentrations of residual free chlorine:					
	10 mg/L		1 mg/L		0.2 mg/L	
	PCR [a]	culture (CFU/100 ml)	PCR	culture (CFU/100 ml)	PCR	culture (CFU/100 ml)
Before treatment	＋＋＋	1.7×10^7	＋＋＋	1.7×10^7	＋＋＋	1.7×10^7
After 10 min	＋	< 10	＋＋＋	< 10	＋＋＋	< 10
30 min	－	< 10	＋＋＋	< 10	＋＋＋	< 10
60 min	－	< 10	＋＋	< 10	＋＋＋	< 10
120 min	－	< 10	－	< 10	＋＋＋	< 10
180 min	－	< 10	－	< 10	＋＋	< 10
360 min	－	< 10	－	< 10	＋	< 10
720 min	－	< 10	－	< 10	＋	< 10
1440 min	－	< 10	－	< 10	－	< 10

[a] Intensity of the amplified DNA band on the gel image is indicated in four grades:
＋＋＋, bright; ＋＋, clear; ＋, dim but visible; －, not visible.

表 4-3　PCR 法と培養法によるレジオネラ属菌検出に対する各種殺菌剤の影響

	H_2O_2 [a]		GA [b]		CMI [c]		BNPD [d]	
	PCR [e]	culture (CFU/100 ml)	PCR	culture (CFU/100 ml)	PCR	culture (CFU/100 ml)	PCR	culture (CFU/100 ml)
Before treatment	＋＋＋	9.8×10^6	＋＋＋	1.7×10^7	＋＋＋	1.7×10^7	＋＋＋	1.7×10^7
After 24h	－	< 10	＋＋＋	< 10	＋＋＋	< 10	＋＋＋	6×10
48h	－	< 10	＋＋＋	< 10	＋＋＋	< 10	＋＋＋	< 10

[a] Hydrogen peroxide (15500 mg/liter)

[b] Glutaraldehyde (20 mg/liter)

[c] 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (2 mg/liter)

[d] 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol (10 mg/liter)

[e] Intensity of the amplified DNA band on the gel image is indicated in two grades: ＋＋＋, bright; －, not visible.

表 4-4　浴槽水の原水の違いによるレジオネラ属菌数の分布

Legionella counts (CFU/100 ml)	No. of samples	Bath water source	
		Spa water	Tap water
< 10	51	22 (44.9%)	29 (56.9%)
10-90	24	12 (24.5%)	12 (23.5%)
100-990	16	11 (22.4%)	5 (9.8%)
1000-9900	7	4 (8.2%)	3 (5.9%)
> 10000	2	0 (0%)	2 (3.9%)
Total	100	49	51

表4-5　浴槽水の培養法によるレジオネラ属菌数の分布およびLAMP法とPCR法による検出結果の比較

Legionella counts (CFU/100 ml)	No. of samples	LAMP		PCR	
		positive	negative	positive	negative
< 10	51	22	29	20	31
10-90	24	24	0	21	3
100-990	16	16	0	16	0
1000-9900	7	7	0	7	0
> 10000	2	2	0	2	0
Total	100	71	29	66	34

表 4-6　温泉水中の懸濁物質の元素分析結果

Element	Composition (%)[a]
Fe	56
Si	23
S	8
Zn	6
Ca	1

[a] The value shows the percentage of detected elements heavier than sodium

表 4-7　浴槽水からの培養法と LAMP 法によるレジオネラ属菌検出結果

Culture	LAMP		Total
	Positive	Negative	
Positive	292	29	321
Negative	750	1322	2072
Total	1042	1351	2393

表 4-8　浴槽設備の化学洗浄前後の LAMP 法と培養法によるレジオネラ属菌検出結果

Sample	Before treatment		After treatment	
	LAMP	Culture (CFU/100 ml)	LAMP	Culture (CFU/100 ml)
Bath system 1	＋	4800	－	< 10
Bath system 2	＋	20	＋	< 10
Bath system 3	＋	550	－	< 10
Bath system 4	＋	10	－	< 10
Bath system 5	＋	30	－	< 10
Bath system 6	＋	310	－	< 10

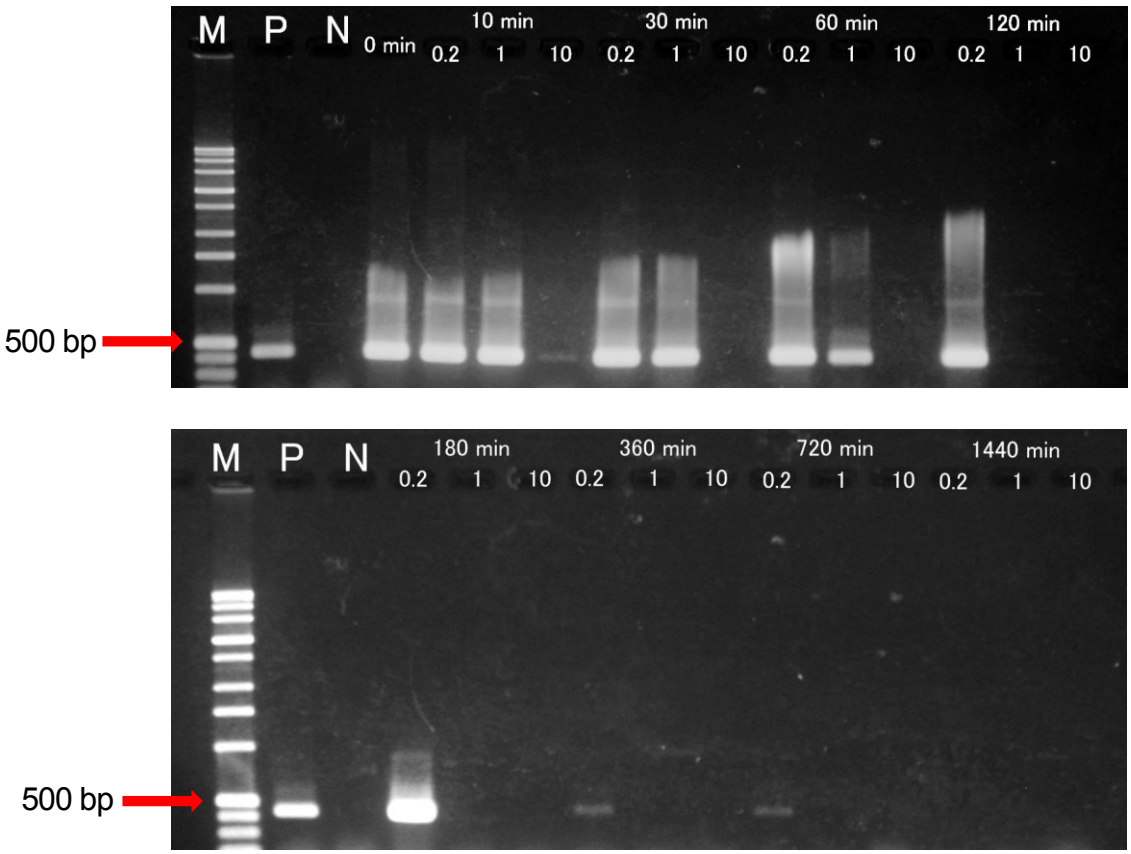

図 4-1　*L. pneumophila* を遊離塩素処理したときの PCR 検出結果

M: 分子量マーカー（100 bp）

P: 陽性対照

N: 陰性対照

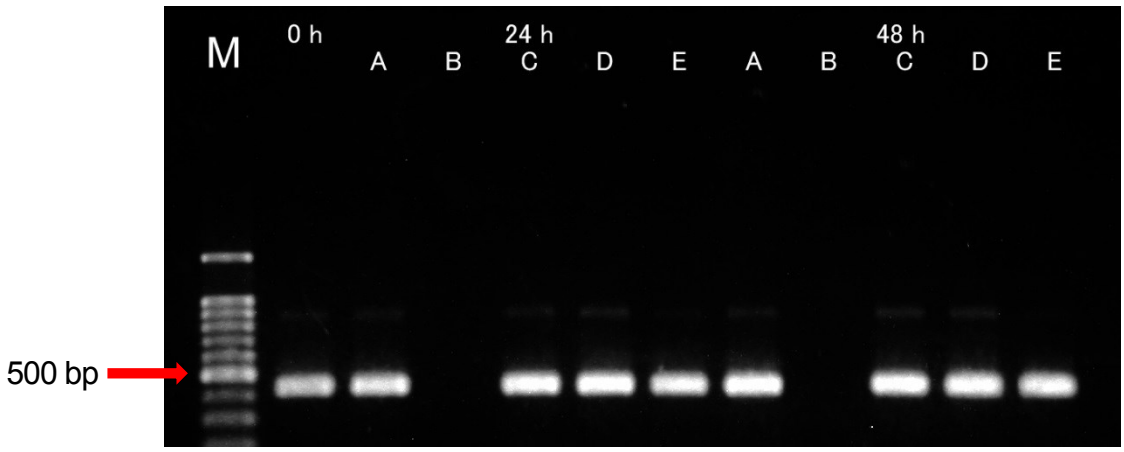

図 4-2　*L. pneumophila* を過酸化水素，グルタルアルデヒド，CMI，BNPD で処理したときの PCR 検出結果

M: 分子量マーカー（100 bp）

A: 無処理

B: 過酸化水素 (15500 mg/L)

C: グルタルアルデヒド (20 mg/L)

D: CMI (2 mg/L)

E: BNPD (10 mg/L)

4.3 考察

塩素やその他殺菌剤の DNA 分解特性を調べた結果から，遊離残留塩素濃度が 10 mg/L 程度の塩素剤もしくは高濃度の過酸化水素水による殺菌洗浄を実施した後の浴槽水や冷却塔水においては，レジオネラ属菌の DNA はそれら殺菌剤によって速やかに分解されることが推測され，レジオネラ属菌の死菌に由来する DNA の検出による PCR 法の陽性判定は少なくなると判断される．したがって，高濃度塩素や過酸化水素による洗浄の後においても PCR 法でレジオネラ属菌が検出された場合は，配管や設備機器内部にレジオネラ属菌を含むバイオフィルムが残存していると判断するのが妥当であろう．一方，塩素や過酸化水素以外の殺菌剤を使用している冷却塔水系ではレジオネラ属菌は殺菌されるが，DNA の分解には至らない．その結果，レジオネラ属菌の死菌や DNA が冷却塔水中に残存し，培養法による検査ではレジオネラ属菌不検出，PCR 法による検査ではレジオネラ属菌陽性となるため，PCR 法による検査の陽性率が高くなると予測される．

100 検体の浴槽水から LAMP 法，PCR 法および培養法によってレジオネラ属菌を検出した場合，培養法によって不検出の 51 検体中 LAMP 法では 22 検体（43%）が陽性，PCR 法では 20 検体（39%）が陽性であった．これに対して，培養法でレジオネラ属菌が検出された検体について，LAMP 法では 100%陽性，PCR 法では 94%陽性と一致率が高かった．培養法で不検出の検体が LAMP 法や PCR 法で陽性となる要因は死菌や培養不能（VBNC）菌の存在があるが，浴槽水においてもこれらの影響を受けている可能性がある．適切な塩素消毒がなされて浴槽水中に浮遊性のレジオネラ属菌が生菌として存在しない場合でも，浴槽系内にバイオフィルムが存在して常時レジオネラ属菌が供給されるような場合には遺伝子検出法では陽性となることが考えられる．

培養法陽性検体のうち 4 検体が PCR 法では陰性となった．このうち，培養法で 8800 CFU/100 ml 検出した 1 検体は，エタノール沈殿による DNA 精製操作を行ったところ PCR 法陽性となった．この 1 検体は多量の茶褐色の懸濁物質を含んでおり，その主成分は鉄およびケイ素であった（表 4-6）．この懸濁物質中に何らかの PCR 阻害物質が含まれると推察するが，LAMP 法ではこの検体を DNA 精製せずに検出できており，LAMP 法が PCR 法と比較して反応阻害物質の影響を受けにくいことを示唆する結果となった. 血液中の PCR 阻害物質として鉄イオンやカルシウムイオンが報告されているが（Al-Soud and Rådström, 2001），これらは温泉浴槽水にも含まれている場合がある（表 4-6）．また，土壌中の PCR 阻害物質としてフミン酸，フルボ酸等の有機化合物が報告されているが（Watson and Blackwell, 2000），温泉浴槽水にもこれらの物質を含むものがあると推察する．

培養法陽性検体のうち PCR 法陰性となった残りの 3 検体については，培養法で得られたレジオネラ属菌数はそれぞれ 10 から 60 CFU/100 ml と少ない菌数であり，DNA 精製後も PCR 法陰性であったため，これら 3 検体が PCR 法陰性となった原因は PCR 阻害物質の影響というよりも，むしろ PCR 法の検出感度によるものと思われる. 一方，LAMP 法ではこれら 3 検体全てを陽性と判定しており，本検討の手法による検出感度についてはおよそ 10 CFU/100 ml 以上を検出することが示唆された．

菌体からのDNA抽出法としてlysozymeやproteinase K等の酵素を用いた場合，抽出操作に2時間程度要する．これに対して今回行ったアルカリ熱抽出法は30分以内でDNAを抽出できるため，検査の迅速化に有効である．また，抽出操作手順が少なく簡便なため，DNAの損失を最小限に抑えることができると考える．ただし，アルカリ熱抽出法では遺伝子増幅阻害物質を除去できないため，特にPCR法を用いる場合は有効なDNA精製操作を組み込む必要がある．

LAMP法と培養法による浴槽水のレジオネラ属菌検査検査結果の解析から，培養法で陽性の検体をLAMP法で陰性と判定する割合は1.2%（2393検体中29検体）であった．その原因はレジオネラ属菌数が少ない（10から80 CFU/100 ml）こと，または温泉水中に含まれるLAMP反応阻害物質の影響が考えられる．また，LAMP法レジオネラ検出試薬キット*E*で検出できないレジオネラ属菌種（*Legionella* sp. L-47株）の存在（29検体中9検体）も要因であった．*L. londiniensis*はLAMP法レジオネラ検出試薬キット*E*で検出できないことが知られているが，他にも検出できない未知のレジオネラ属菌が存在することに注意が必要である．ただし，*L. londiniensis*は専用のプライマーセット（ニッポンジーン）を用いればLAMP法で検出可能である．

浴槽設備の化学的殺菌洗浄の評価では6系統中1系統で洗浄後の検査結果がLAMP法陽性，培養法陰性となった（表4-8）．十分な濃度の塩素と接触することでレジオネラ属菌は殺菌されるだけでなくDNAまで分解されるが，洗浄後にLAMP法陽性だった1系統は，生菌は塩素で殺菌されたがDNAが分解されずに残存したと推察する．

本章の検討結果は遺伝子検出法により浴槽水のレジオネラ属菌を培養法よりも迅速に検出できることを示している．特に浴槽設備の塩素剤を用いた化学的殺菌洗浄後の評価には有効に活用できるだろう．ただし，十分な塩素濃度と十分な接触時間をとらなければレジオネラ属菌は死滅してもその死菌が残存するため，遺伝子検出法と培養法の結果に相違が生じる可能性が高い．逆に，LAMP法でレジオネラ属菌が陰性と判定された検体から培養法でレジオネラ属菌が陽性となる割合は1.2%と低く，LAMP法の結果を安全側の判断とすれば実用上問題ないと考える．

第 5 章　EMA-qPCR 法による浴槽水，冷却塔水からのレジオネラ属菌の検出

前章ではレジオネラ属菌の遺伝子検出法について検討し，塩素洗浄後の浴槽水について有効に遺伝子検出法による洗浄効果の評価ができることを示したが，LAMP 法陽性の検体のうち約 7 割は培養法陰性であった．これらはレジオネラ属菌の死菌に起因することが予想されるため，死菌の検出を抑制した遺伝子検出法の採用が望まれる．Ethidium monoazide（EMA）は第 1 章で述べた通り，死菌に由来する DNA を修飾して PCR 等の遺伝子増幅反応を阻害するため，EMA 処理後に遺伝子増幅することで理論上生菌に由来する DNA を選択的に検出できる．また，EMA 処理によるレジオネラ属菌の生菌検出についても応用が進んでいる（Chang *et al*., 2009; Delgado-Viscogliosi *et al*., 2009; Chang *et al*., 2010; Chen *et al*., 2010; Qin *et al*., 2012）.

本章では EMA 処理した試料から DNA を抽出・精製して，定量 PCR 法によりレジオネラ属菌を検出する手法（EMA-qPCR 法），および EMA 処理しない試料から DNA を抽出・精製して，定量 PCR 法によりレジオネラ属菌を検出する手法（qPCR 法）により，浴槽水，冷却塔水からレジオネラ属菌を検出し，併せて実施した培養法によるレジオネラ属菌検出結果と比較することで，環境水からのレジオネラ属菌検出における EMA 処理の有効性を評価した.

5.1　材料と方法

5.1.1　水試料

2012 年 9 月から 2012 年 12 月にかけて日本各地のビルや工場等の冷却塔から冷却塔水 95 検体，温浴施設や宿泊施設，スポーツクラブ等から浴槽水 111 検体を採水した．採水には 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を 1 ml 添加し，高圧蒸気滅菌（121℃，20 min）した 500 ml のポリプロピレン容器を用い，採水後は冷蔵保存して速やかに検査した.

5.1.2　レジオネラ属菌の培養検査

レジオネラ属菌検査方法は ISO 11731 に準じた．すなわち，採水した浴槽水，冷却塔水をろ過（孔径 0.45 μm，セルロースアセテート製，アドバンテック）または遠心（6400×*g*，30 min）により 100 倍に濃縮し，その一部（500 μl）を培養検査に用い，残りは qPCR，EMA-qPCR による検出のための試料とした．100 倍濃縮試料に等量の 0.2 M 酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）を加え，室温で放置した．10 min 後に GVPC 培地（MERCK）に 200 μl 接種し，37℃のインキュベーター内で培養した．6 日後，培地を観察してレジオネラ属菌が疑われる細菌コロニーを 3 個選び，L-システイン要求性確認試験として血液寒天培地（5%ウマ脱繊維血液添加普通寒天培地）および BCYEα寒天培地に接種し，37℃のインキュベーター内で培養した．2 日後，培地を観察して血液寒天培地に発育せず BCYEα

培地に発育したものをレジオネラ属菌と判定してレジオネラ属菌のコロニーを計数した．検出したレジオネラ属菌は（1 試料あたり 10 株まで）レジオネラ免疫血清（デンカ生研），レジオネラ DDH（極東製薬）を用いて同定した．これらの手法で同定できないレジオネラ属菌は 16S rRNA 遺伝子の部分配列の相同性評価で同定した.

5.1.3　EMA 処理および DNA 抽出・精製

EMA 試薬として Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0（タカラバイオ）を用い，処理方法は添付の取扱説明書に従った．浴槽水，冷却塔水の 100 倍濃縮液の 1 ml を 1.5 ml のマイクロチューブに分注し，14000 × *g* で 10 min 遠心して上清を 960 µl 除去した．試薬 A を 10 µl 添加してボルテックスタイプミキサーで混合した． 2 倍に希釈した試薬 B を 5 µl 添加してボルテックスタイプミキサーで混合し，室温の遮光下で 15 min 放置後に LED CrossLinker 12（タカラバイオ）にセットして 15 min 光照射した DNA 抽出および精製は NucleoSpin Tissue XS（タカラバイオ）を用いた．方法は添付の取扱説明書に従い，20 µl の精製 DNA 試料を得た．加えて，EMA 処理の効果を評価するために EMA 処理なしの試料からも同様に DNA 試料を調製した.

5.1.4　qPCR 法によるレジオネラ属菌の検出

PCR の反応液は Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を用いて調製した．添付の取扱説明書に従い，反応液を 0.2 ml の PCR チューブに調製し，精製 DNA 溶液を 5 µl 添加して全量を 25 µl とした．反応液は Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（タカラバイオ）を用いて増幅反応を行った．反応条件は 95℃で 10 s の熱変性の後，95℃で 5 s，55℃で 10 s，72℃で 20 s を 45 サイクルとし, 2 波長（FAM, ROX）で蛍光検出した. FAM ではレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子の増幅を，ROX では内部対照の増幅を検出し，ROX の増幅が認められない，もしくは著しく遅れて増幅するものは PCR 阻害物質の影響があると判断して解析から除いた.

5.1.5　EMA 処理効果の評価

EMA 処理が適切に行われたかどうかを Control Test Kit（Vaiable bacteria selection，タカラバイオ）を用いて評価した．EMA 試薬である Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 には，あらかじめ人工の Control DNA が添加されており，EMA 処理が阻害されることなく行われた場合は，この Control DNA も EMA により修飾を受けるので，PCR での増幅が不能になる．Control Test Kit はこの Control DNA を PCR 増幅するための試薬で，増幅が認められた場合は EMA 処理が不完全だったと判断できる．Control Test Kit 添付の取扱説明書に従い，反応液を 0.2 ml の PCR チューブに調製し，

精製 DNA 溶液を 5 µl 添加して全量を 25 µl とした. 反応液は Thermal Cycler Dice Real Time System *II* を用いて増幅反応を行った．反応条件は 95℃で 10 s の熱変性の後，95℃で 5 s，55℃で 10 s，72℃で 20 s を 45 サイクルとし，1 波長（FAM）で蛍光検出した．45 サイクル以内に増幅が認められた試料は EMA 処理が不完全と判断した．ただし，精製 DNA 試料残量の都合から，冷却塔水 48 試料についてのみ本評価を実施した.

5.2 結果

5.2.1 浴槽水からのレジオネラ属菌検出

浴槽水からの培養法，qPCR 法および EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌の検出結果を表 5-1 に示す．111 検体の浴槽水から培養法でレジオネラ属菌が検出したのは 30 検体（27%）で，調べた全ての株は *L. pneumophila*（30 検体中 30 検体，100%）と同定された． qPCR 法でレジオネラ属菌が検出したのは 85 検体（77%），EMA-qPCR 法でレジオネラ属菌が検出したのは 49 検体（44%）であった. 内部対照の DNA は全ての試料で増幅しており, PCR 阻害物質の影響は認められなかった. 培養法不検出の 81 検体のうち，qPCR では 56 検体，EMA-qPCR では 23 検体が陽性だった．すなわち，EMA 処理により培養法陰性，qPCR 陽性の不一致数が 56 検体から 23 検体に半分以下に減少した．培養法でレジオネラ属菌が検出した 30 検体のうち，1 検体（10 CFU/100 ml）は qPCR 法で陰性と判定し，4 検体（10，20，20，30 CFU/100 ml）は EMA-qPCR 法でレジオネラ属菌陰性と判定した．このとき，qPCR 法で陰性だった 1 検体は EMA-qPCR 法では陽性に転じた.

5.2.2 冷却塔水からのレジオネラ属菌検出

冷却塔水からの培養法，qPCR 法および EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌の検出結果を表 5-2 に示す. 1 検体はレジオネラ属菌が夾雑微生物の影響により検出不能, 12 検体は PCR 阻害物質の影響で内部対照の DNA の増幅が認められなかった．したがって，これら 13 検体はデータ解析から除いた．82 検体の冷却塔水から培養法でレジオネラ属菌が検出したのは 27 検体（33%）で，これらの株は *L. pneumophila*（27 検体中 20 検体, 74%）, *L. pneumophila* と *L. quinlivanii*（27 検体中 1 検体, 4%）, *L. pneumophila* と *L. gratiana*（27 検体中 1 検体, 4%）, *L. feeleii*（27 検体中 2 検体, 7%）, *L. busanensis*（27 検体中 1 検体, 4%）, *Legionella* sp.（27 検体中 2 検体, 7%）と同定された．qPCR 法でレジオネラ属菌が検出したのは 80 検体（98%），EMA-qPCR 法でレジオネラ属菌が検出したのは 80 検体（98%）であった．培養法不検出の 55 検体のうち，qPCR と EMA-qPCR どちらも 53 検体が陽性だった．すなわち，EMA 処理しても培養法陰性，qPCR 陽性の不一致数に変わりがなく，EMA 処理の効果は認められなかった.

5.2.3　冷却塔水の EMA 処理効果の評価結果

冷却塔水 48 検体の EMA 処理効果を Control Test Kit で調べたところ，33 検体（69%）が EMA 処理不完全であった．よって，冷却塔水では EMA 処理自体が阻害されるため，EMA 処理効果が得られないことが示唆された．しかし，Control Test Kit で EMA 処理効果が認められた 15 検体のうち，培養法でレジオネラ属菌が不検出であった 9 検体はすべて qPCR 法で陽性と判定した．

表 5-1　浴槽水の培養法によるレジオネラ属菌の菌数分布および PCR 法，EMA-qPCR 法による
レジオネラ属菌検出結果

Legionella counts (CFU/100 ml)	No. of samples		PCR				EMA-PCR			
			Positive		Negative		Positive		Negative	
< 10	81	(73.0%)	56	(65.9%)	25	(96.2%)	23	(46.9%)	58	(93.5%)
10-40	14	(12.6%)	13	(15.3%)	1	(3.8%)	10	(20.4%)	4	(6.5%)
50-90	2	(1.8%)	2	(2.4%)	0	(0%)	2	(4.1%)	0	(0%)
100-990	11	(9.9%)	11	(12.9%)	0	(0%)	11	(22.4%)	0	(0%)
1000-9900	3	(2.7%)	3	(3.5%)	0	(0%)	3	(6.1%)	0	(0%)
Total	111	(100%)	85	(100%)	26	(100%)	49	(100%)	62	(100%)

表 5-2　冷却塔水の培養法によるレジオネラ属菌の菌数分布および PCR 法，EMA-qPCR 法による
レジオネラ属菌検出結果

Legionella counts (CFU/100 ml)	No. of samples		PCR				EMA-PCR			
			Positive		Negative		Positive		Negative	
< 10	55	(67.1%)	53	(66.2%)	2	(100%)	53	(66.2%)	2	(100%)
10-100	13	(15.9%)	13	(16.2%)	0	(0%)	13	(16.2%)	0	(0%)
100-990	7	(8.5%)	7	(8.8%)	0	(0%)	7	(8.8%)	0	(0%)
1000-9900	4	(4.9%)	4	(5.0%)	0	(0%)	4	(5.0%)	0	(0%)
10000-99000	3	(3.7%)	3	(3.8%)	0	(0%)	3	(3.8%)	0	(0%)
Total	82	(100%)	80	(100%)	2	(100%)	80	(100%)	2	(100%)

5.3 考察

本章の検討結果は，浴槽水については EMA 処理により qPCR 法陽性，培養法陰性の不一致は半減しており，EMA-qPCR 法は浴槽水のレジオネラ属菌迅速検出法として有用であることを示している．一方，冷却塔水については EMA 処理の効果が認められなかった．その要因としては冷却塔水試料には沈殿物を多く含むものも見られ，その影響によって EMA 処理が阻害されたためだと推察される．しかし，Control Test Kit で EMA 処理効果が認められた 15 検体のうち，培養法でレジオネラ属菌が不検出であった 9 検体はすべて qPCR 法で陽性と判定しているため，培養法でレジオネラ属菌不検出の検体の中にも EMA で処理されないレジオネラ属菌が存在したと考えるのが妥当であろう．

培養法のレジオネラ属菌数と qPCR 法によるレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数をプロットした散布図を図 5-1（浴槽水），図 5-2（冷却塔水）に示すが，浴槽水，冷却塔水ともに培養法の菌数と qPCR 法のコピー数に相関は認められなかった．したがって，EMA-qPCR 法の結果から培養法のレジオネラ属菌数を予測することは難しいと思われる．

浴槽水については，内部対照の増幅結果からも PCR 阻害物質の影響は認められず，今回検討した検体については本手順の DNA 精製によって PCR 阻害物質を除去できたと考える．EMA-qPCR 法の場合 10 から 30 CFU/100 ml の検体を 4 試料陰性と判定した．これらの菌数は培養法の検出下限（10 CFU/100 ml）に近く，確率論的に陰性となった可能性が高いと判断できるため，qPCR 法の検出下限は概ね 10 CFU/100 ml のレジオネラ属菌を検出できるレベルにあると推察するが，実用化にあたっては更なる感度の調整が必要かもしれない．一方，冷却塔水については PCR 阻害物質の影響も認められたため，本手順の DNA 精製では不十分かもしれない．また，EMA 処理の効果も認められないため，冷却塔水のレジオネラ属菌検査への EMA-qPCR 法の適用は現段階では難しいと考える．

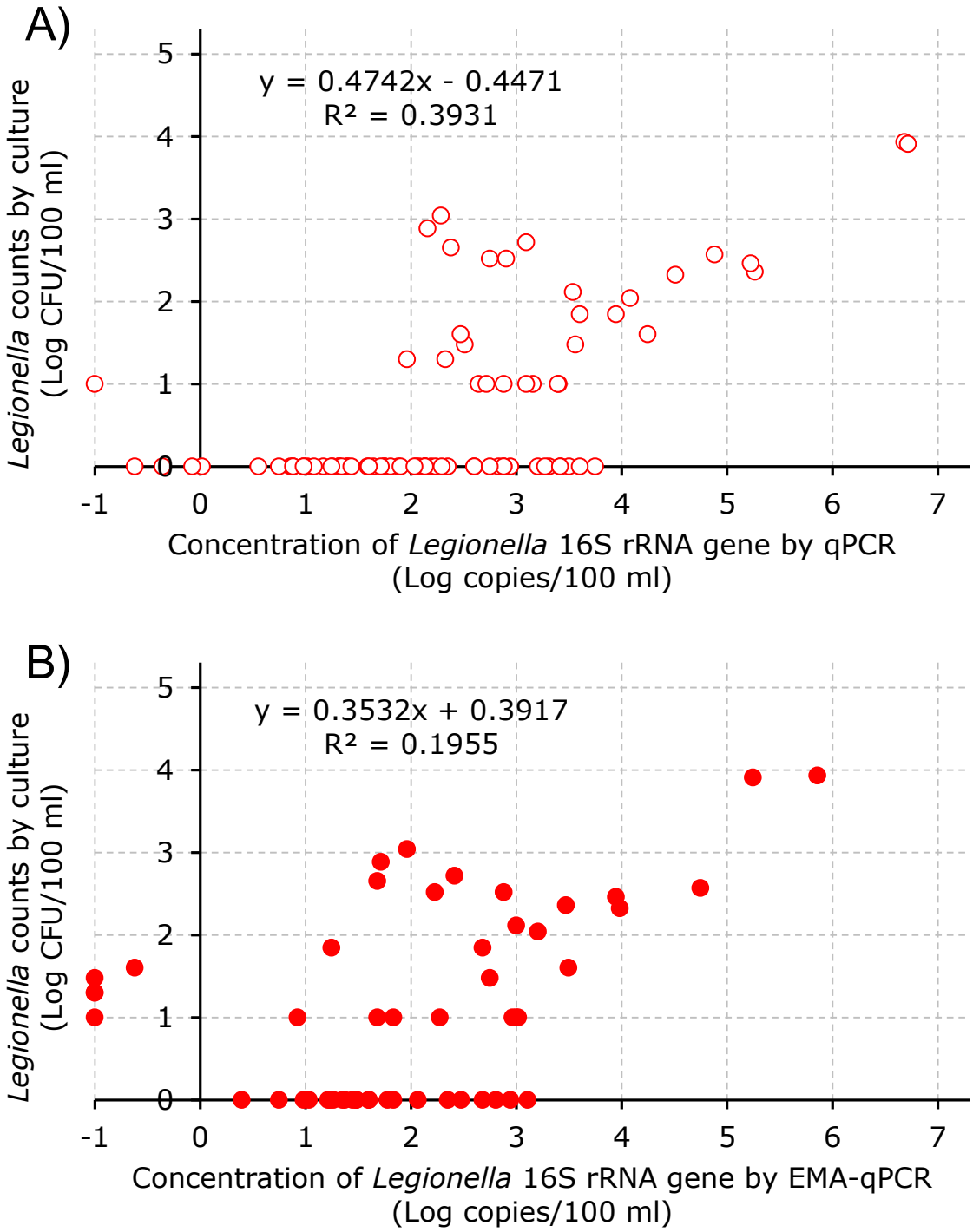

図 5-1　浴槽水から qPCR 法と EMA-qPCR 法で検出したレジオネラ属菌遺伝子の定量値の比較.
(A) EMA 処理なし.　(B) EMA 処理あり.

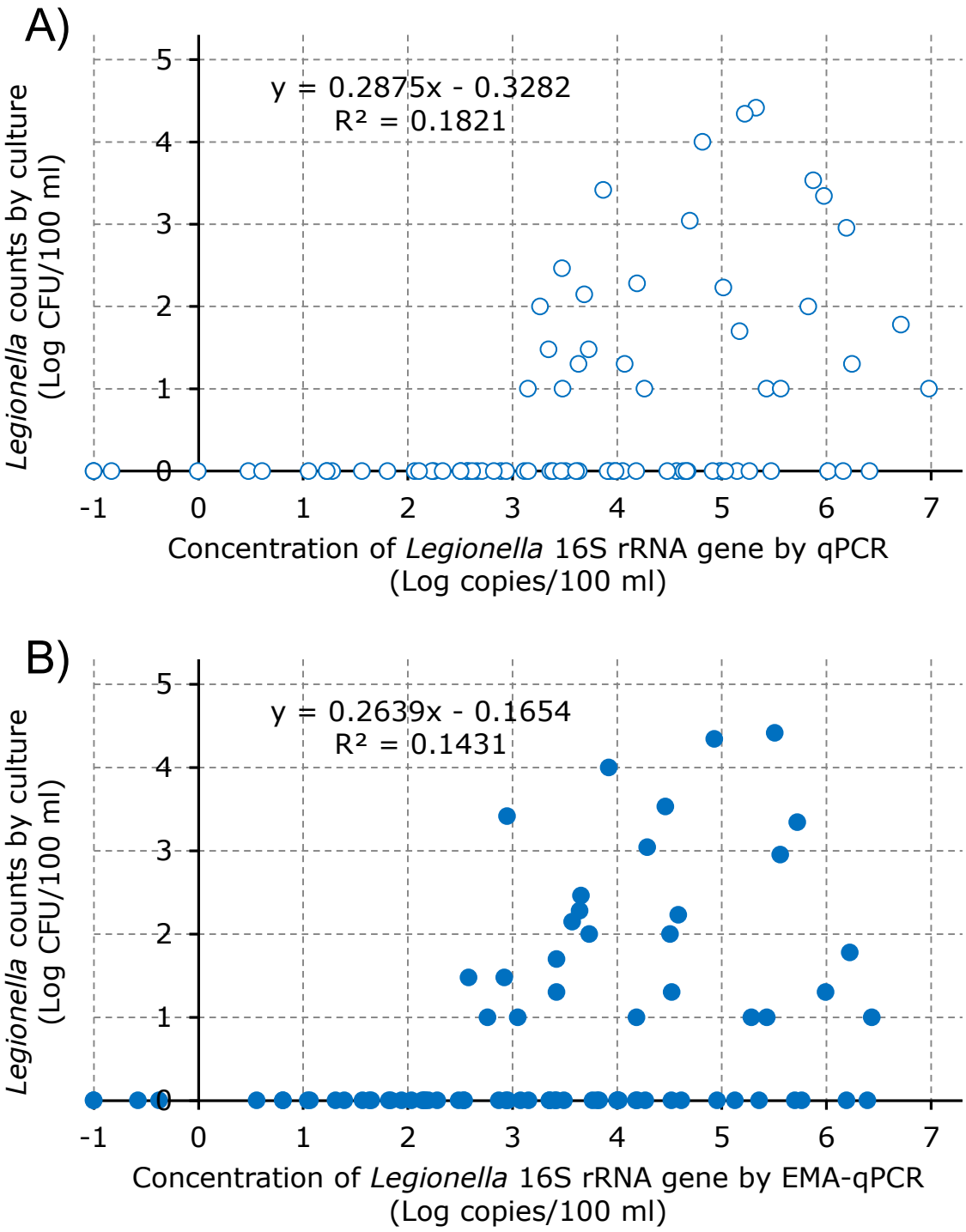

図 5-2　冷却塔水から qPCR 法と EMA-qPCR 法で検出したレジオネラ属菌遺伝子の定量値の比較.
(A) EMA 処理なし.　(B) EMA 処理あり.

第 6 章　EMA-qPCR 法，クローンライブラリーによる環境水中のレジオネラ属菌の多様性の解析

前章の検討結果から，EMA 処理は浴槽水の PCR 検査においてレジオネラ属菌の死菌に起因すると考えられる陽性率を半減させたが，冷却塔水の検査では効果が認められなかった．その要因として VBNC 状態のレジオネラ属菌の存在が推測された．環境水中の VBNC 状態のレジオネラ属菌の存在についてはこれまでにも示唆されているが，どのような菌種がどのくらい存在するのか詳細には解明されていない．また，Wéry *et al*.（2008）は冷却塔に生息するレジオネラ属菌の多様性を示し，既存種に該当しないレジオネラ属菌の存在を明らかにしているが，培養法の結果とは比較していない．

本章では冷却塔水および浴槽水から培養法と EMA-qPCR 法で検出されるレジオネラ属菌の相違を調査することを目的とし，レジオネラ属菌の DNA と *L. pneumophila* の DNA をそれぞれ定量して，冷却塔水および浴槽水に生息するレジオネラ属菌のうち，*L. pneumophila* の占める割合を算出した．さらに，EMA 処理後の PCR 増幅産物をクローンライブラリー解析することで，EMA-qPCR 法で検出しているレジオネラ属菌を分類した．

6.1　材料と方法

6.1.1　水試料

2012 年 11 月から 2014 年 1 月にかけて，ビルや工場の冷却塔，および宿泊施設やスポーツクラブの浴槽から冷却塔水（6 試料），浴槽水（3 試料）を採水した．試料の詳細は表 6-1 に示す．採水には 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を 1 ml 添加し，高圧蒸気滅菌（121℃，20 min）した 500 ml のポリプロピレン容器を用い，採水後は冷蔵保存して速やかに検査した．

6.1.2　レジオネラ属菌の培養検査

レジオネラ属菌検査方法は ISO 11731 に準じた．すなわち，採水した浴槽水，冷却塔水をろ過（孔径 0.45 μm，セルロースアセテート製，アドバンテック）または遠心（6400×*g*，30 min）により 100 倍に濃縮し，その一部（500 μl）を培養検査に用い，残りは EMA-qPCR 法による検出およびクローンライブラリー作製のための PCR に用いた．100 倍濃縮試料に等量の 0.2 M 酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）を加え，室温で放置した．10 min 後に GVPC 培地（MERCK）に 200 μl 接種し，37℃のインキュベーター内で培養した．6 日後，培地を観察してレジオネラ属菌が疑われるコロニーを 3 個選び，L-システイン要求性確認試験として血液寒天培地（5%ウマ脱繊維血液添加普通寒天培地）および BCYEα寒天培地に接種し，37℃のインキュベーター内で培養した．2 日後，培地を観察して血液寒

天培地に発育せず BCYEα培地に発育したものをレジオネラ属菌と判定してレジオネラ属菌のコロニーを計数した．検出したレジオネラ属菌（50 から 100 株，ただし得られた株数が少ない試料は全株）はレジオネラ免疫血清（デンカ生研），レジオネラ DDH（極東製薬）を用いて同定した．これらの手法で同定できないレジオネラ属菌は 16S rRNA 遺伝子の部分配列の相同性評価で同定した．

6.1.3　EMA 処理および DNA 抽出・精製

EMA 試薬として Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0（タカラバイオ）を用い，処理方法は添付の取扱説明書に従った．浴槽水，冷却塔水の 100 倍濃縮液の 1 ml を 1.5 ml のマイクロチューブに分注し，14000 × *g* で 10 min 遠心して上清を 960 µl 除去した．試薬 A を 10 µl 添加してボルテックスタイプミキサーで混合した．2 倍に希釈した試薬 B を 5 µl 添加してボルテックスタイプミキサーで混合し，室温の遮光下で 15 min 放置後に LED CrossLinker 12（タカラバイオ）にセットして 15 min 光照射した．

DNA 抽出は Beige *et al.*（1995）の方法を参考にした．1 ml の 100 倍濃縮液を遠心し（14000 × *g*, 10 min，4℃），上清を 950 µl 除去して 50 mM 水酸化ナトリウム溶液を 50 µl 添加した．ボルテックスタイプミキサーで撹拌後，95℃のヒートブロックで 15 min 加熱した．8 µl の 1 M Tris-HCl 緩衝液（pH 7）を添加して中和した．再度遠心し（14000 × *g*，10 min，4℃）上清を DNA 溶液とした．得られた DNA 溶液全量を NucleoSpin gDNA Clean-up kit（タカラバイオ）で精製し，50 µl の精製 DNA を得た．

6.1.4　レジオネラ属菌および *L. pneumophila* の DNA 定量

はじめに qPCR に用いる陽性対照を調製した．あらかじめ BCYEα培地で培養（30℃，2 日間）しておいた *L. pneumophila* ATCC33152 株を 100 µl の滅菌蒸留水に懸濁した．100 µl の 50 mM NaOH 溶液を添加して 95℃のヒートブロックで 15 min 加熱し，16 µl の 1 M Tris-HCl 緩衝液（pH 7）を加え中和して DNA 抽出液を得た．DNA 抽出液中に混在する RNA を除去するために RNase A（タカラバイオ）で処理した後，NucleoSpin gDNA Clean-up kit（タカラバイオ）で添付の取扱説明書に従って精製し，100 µl の精製 DNA 溶液を得た．精製 DNA 溶液は GeneQuant *pro*（amersham pharmacia biotech）で DNA 濃度を定量し，TE（1 M Tris-HCl，1 mM EDTA）溶液で 20 pg/µl に希釈した．これを TE 溶液で 10 倍の段階希釈列を調製して陽性対照とし，Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を用いて，16S rRNA 遺伝子のコピー数に換算した．

環境水中に生息するレジオネラ属菌のうち *L. pneumophila* の存在比率を求めるために，レジオネラ属菌の DNA と *L. pneumophila* の DNA をそれぞれ qPCR 法で定量した．レジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子は LEG-225F（5’- AAG ATT AGC CTG CGT CCG AT -3’）と LEG-858R（5’-GTC AAC TTA

TCG CGT TTG CT-3’）をレジオネラ属菌特異的プライマー（Miyamoto *et al*., 1997）として，*L. pneumophila* の *mip* 遺伝子は *Lmip*L920（5'-GCT ACA GAC AAG GAT AAG TTG-3'）と *Lmip*R1548（5'-GTT TTG TAT GAC TTT AAT TCA-3'）を *L. pneumophila* 特異的プライマー（Mahbubani *et al*., 1990）として用いた．PCR の反応液は TaKaRa Ex Taq Hot Start Version（タカラバイオ）を用いて調製した．反応液 1 本あたり，16.45 µl の滅菌超純水，3 µl の 10 × Ex Taq buffer，2.4 µl の dNTPs（2.5 mM），1 µl の Forward primer，1 µl の Reverse primer，1 µl の SYBR Green I（Lonza）の 1000 倍希釈ジメチルスルホキシド溶液，0.15 µl の Ex Taq polymerase（5 U/µl）を混合し，DNA 溶液を 5 µl 添加して全量を 30 µl とした．反応液は Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（タカラバイオ）を用いて増幅反応を行った．反応条件は 95℃で 2 min の熱変性の後，95℃で 15 s，65℃で 30 s，72℃で 60 s を 45 サイクルとし，続けて融解曲線分析のために 50℃から 95℃まで 10 s に 0.5℃の割合で増加させた．検出は 1 波長の蛍光検出（FAM）とした．レジオネラ属菌の DNA と *L. pneumophila* の DNA は陽性対照から得たそれぞれの検量線（図 6-1）から算出し，*L. pneumophila* の存在比率を求めた．クローニングのための PCR のサイクル数は，PCR のバイアスを少なくするために（Nishizawa *et al*., 2008），qPCR の増幅曲線の蛍光強度がプラトー値の 50%に達するまでのサイクル数（図 6-2）とした．

6.1.5　レジオネラ属菌のクローンライブラリー解析

クローンライブラリー解析に用いるレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子は LEG-225F と LEG-858R を用いて増幅した．PCR の反応液は TaKaRa Ex Taq Hot Start Version（タカラバイオ）を用いて調製した. 反応液 1 本あたり, 17.45 µl の滅菌超純水, 3 µl の 10 × Ex Taq buffer, 2.4 µl の dNTPs (2.5 mM), 1 µl の Forward primer，1 µl の Reverse primer，0.15 µl の Ex Taq polymerase（5 U/µl）を混合し，DNA 溶液を 5 µl 添加して全量を 30 µl とした．反応液は Thermal Cycler SP（タカラバイオ）を用いて増幅反応を行った．反応条件は 95℃で 2 min の熱変性の後，95℃で 15 s，65℃で 30 s，72℃で 60 s を 6.1.4 で決定したサイクル数とした．PCR 増幅産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動で増幅産物のサイズ（650 bp）と特異性を確かめた．特異性が認められた PCR 増幅産物は QIAquick PCR purification kit（Qiagen）で精製した．精製した増幅産物は Mighty TA-cloning kit（タカラバイオ）を用い，取扱説明書に従い pMD20-T vector にライゲーションした．そして，*E. coli* DH5α Competent Cells（タカラバイオ）を用い，取扱説明書に従って形質転換してクローンのプラスミド DNA を得た．目的の塩基配列は M13 primer RV (5’-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3’) または M13 primer M4 (5’-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3’) および BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（Applied Biosystems）を用いて，取扱説明書に従ってシークエンス反応を行い，Applied Biosystems 3013xl genetic analyzer（Applied Biosystems）で分析した．DNA の塩基配列は MEGA5（http://www.megasoftware.net）を用いて解析し，ベクターとプライマーの配列を除いた後，BLAST 検索により GenBank/DDBJ/EMBL のデータベースに登録された DNA 塩基配列と比較した．操作的

分類単位（OTU）は得られた全てのクローン配列を Mothur platform（http://www.mothur.org）を用いて，99%以上の類似度を持つ配列と定義した．隣接結合法による分子系統樹は MEGA5 を用いて作製した．多様性の指標（Chao1，Simpson，Shannon-Wiener，Good's coverage）は Mothur platform を用いてカットオフレベルを 0.01 として計算した．レアファクション曲線は FastGroupII（http://fastgroup.sdsu.edu）を用いて 99%以上の類似度を持つ配列で作製した.

6.1.6　塩基配列のアクセッションナンバー

本解析で得られたレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子の部分配列は DDBJ にアクセッションナンバーAB857847 から AB858225 および AB933772 から AB934017 として登録した.

表 6-1　水試料の採水前の処理状況

Sample ID	Sampling site	Treatment condition	Concentration of biocide	Sampling date
Cooling tower waters				
CTW-A	a building in Niigata	no treatment	none	November 6, 2012
CTW-B	a plant in Tokyo	continuous supply of CMI [a]	< 0.1 mg/L (CMI)	February 7, 2013
CTW-C	a factory in Yamanashi	intermittent supply [b] of CMI	< 0.1 mg/L (CMI)	February 14, 2013
CTW-G	a factory in Saitama	continuous supply of CMI	< 0.1 mg/L (CMI)	December 3, 2013
CTW-H	a building in Kanagawa	continuous supply of CMI	< 0.1 mg/L (CMI)	January 17, 2014
CTW-I	a factory in Fukuoka	continuous supply of stabilized chlorine	2.0 mg/L (total chlorine)	November 29, 2013
Bath waters				
BW-D	a sports club in Kanagawa	continuous supply of free chlorine	1.0 mg/L (free chlorine)	March 21, 2013
BW-E	a hotel in Miyagi	continuous supply of free chlorine	no data (free chlorine)	April 23, 2013
BW-F	a sports club in Osaka	continuous supply of free chlorine	0.5 mg/L (free chlorine)	May 15, 2013

[a] 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one

[b] The water treatment chemicals including CMI were batch fed as necessary.

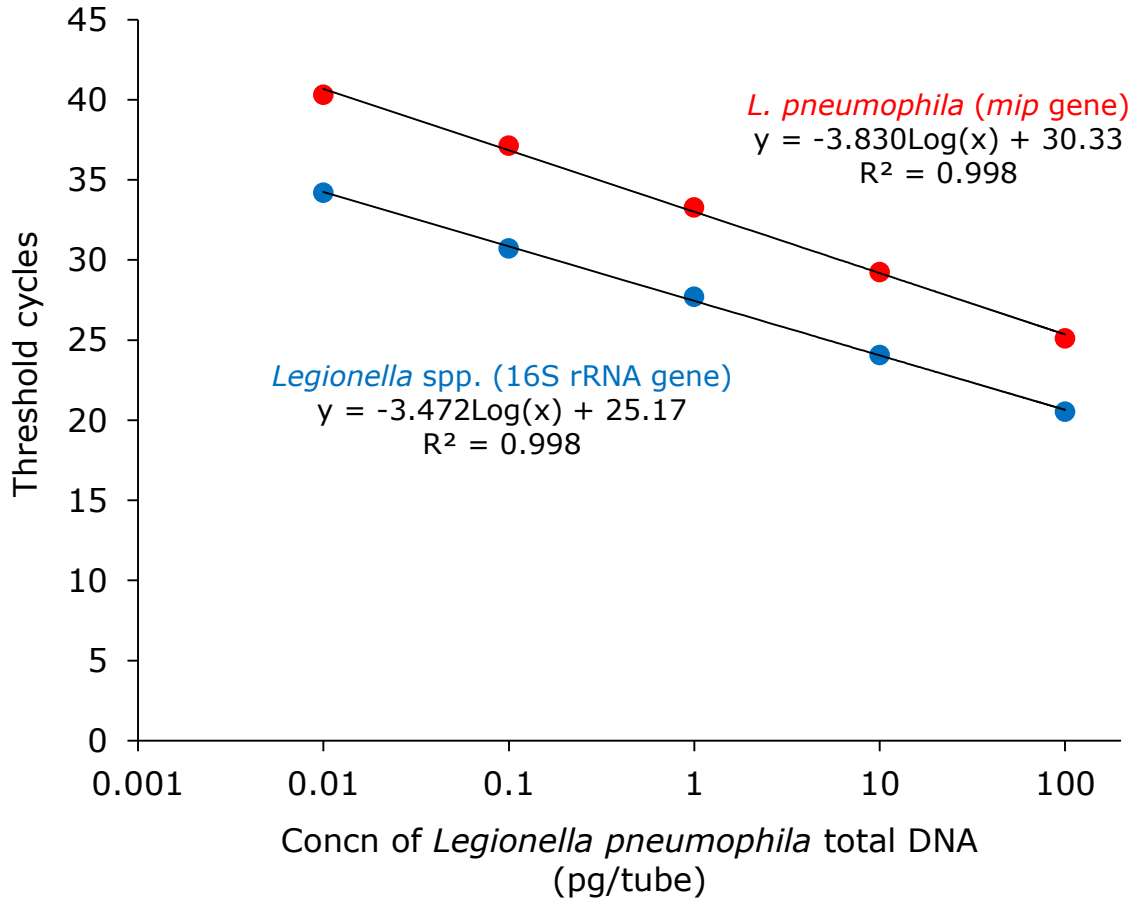

図 6-1　16S rRNA gene と *mip* gene の定量 PCR 法による検量線. *Legionella* spp. (16S rRNA gene) と *L. pneumophila* (*mip* gene) の遺伝子量をそれぞれ定量し, 次式により各試料中の *L. pneumophila* の DNA 量の比率を求めた.

%*L. pneumopnila* = [(qPCR value of *L. pneumophila*) / (qPCR value of *Legionella* spp.)] × 100

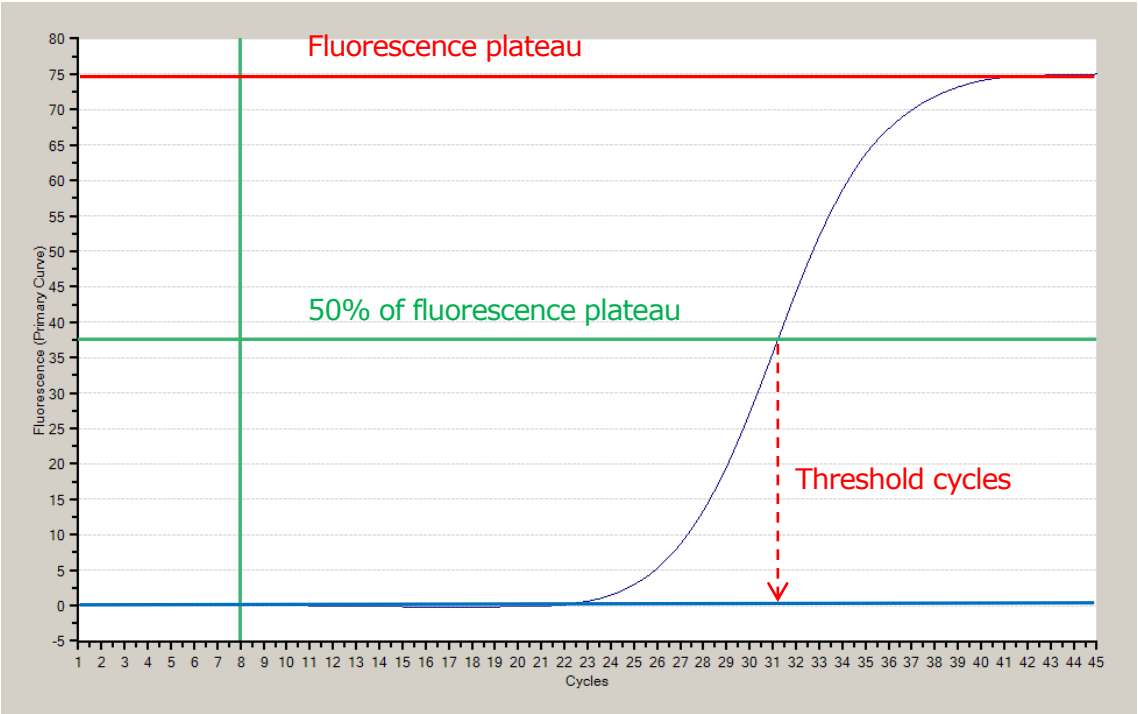

図 6-2　クローニングのための PCR サイクル数決定

6.2 結果

6.2.1 培養法と EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌検出結果の比較

図 6-3 は冷却塔水と浴槽水からレジオネラ属菌の生菌の存在量を培養法と EMA-qPCR 法で定量したときの関係，および培養法と EMA-qPCR 法の結果から求めた *L. pneumophila* の比率を示す．培養法によるレジオネラ属菌の 100 ml あたりの定量値は 10 未満から 7.6×10^4 CFU であり，EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌の生菌由来の 16S rRNA 遺伝子の 100 ml あたりのコピー数は 6.0×10^2 から 2.4×10^5 コピーであった．6 試料の冷却塔水のうち，4 試料（CTW-B，-C，-G，-I）の 16S rRNA 遺伝子のコピー数は 10^5 copies/100 ml 程度で，他の 2 試料の冷却塔水（CTW-A，-H）よりも約 100 倍，浴槽水よりも約 10 から 100 倍高い値を示した．培養法によるレジオネラ属菌の生菌数は浴槽水および 3 試料の冷却水（CTW-A，-C，-I）では 10 CFU/100 ml 以上で，他の冷却塔水より高い値を示した．また，同条件で陽性対照（*L. pneumophila* ATCC33152 株の段階希釈液）を定量したときの結果も合わせてプロットしたところ，培養法の定量値と EMA-qPCR 法の定量値は高い相関（$y = 0.45x^{1.05}$，$R^2 = 0.996$）を示した．

培養法で得られたレジオネラ属菌を同定したところ，菌数の少なかった CTW-G および検出下限未満だった CTW-H 以外の試料の優占種は *L. pneumophila* であった．CTW-G から得られた全株（4 株）のレジオネラ属菌は *Legionella* sp. LC2720（アクセッションナンバーは JN381005），CTW-B から得られた 1 株のレジオネラ属菌は *Legionella* sp. L-29（アクセッションナンバーは AB856218）の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列（約 1500 bp）と 100%の一致を示した．*Legionella* sp. L-29 は著者らが 2006 年 9 月に冷却塔水から分離したレジオネラ属菌で，既存種に該当せず長波長の紫外線を照射すると青白の蛍光を発する株である（未発表）．BW-D から得られたレジオネラ属菌のうち約 20%は *L. dumoffii* と同定された．

EMA-qPCR 法の結果より求めた *L. pneumophila* の DNA の比率は，培養法の結果より求めた *L. pneumophila* の比率よりも低かった．特に冷却塔水ではその傾向が強く，*L. pneumophila* の DNA の比率が低い試料ほど，陽性対照のプロットから離れる傾向が見られた．

6.2.2 レジオネラ属菌のクローンライブラリー解析

図 6-4 はレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子の部分配列（616 bp）と得られた OTU の代表クローンをもとに作製した近隣結合法による分子系統樹である．冷却塔水 6 試料，浴槽水 3 試料から合わせて 617 のクローン（冷却塔水から 417 クローン，浴槽水から 200 クローン）を得て，99 の OTU に分類した．最も豊富な OTU（137 クローン，全体の 22%）は ctw-A-9（AB858105）を代表とし，*L. pneumophila* のクラスターに分類された．BW-E および BW-F の優占種は *L. pneumophila* であるこ

とがクローンライブラリー解析によって確認された．BW-D では *L. pneumophila* はクローンライブラリーの主要な構成種（34%）であった．一方，冷却塔水においては *L. pneumophila* のクローンは大変少なく，CTW-G と-H は 0%，その他は 1%から 11%であった．bw-D-15（AB857853）に代表される *L. maceachernii* に分類される OTU（43 クローン，全体の 7%）は BW-D の優占種（65%），BW-E の希少種（1%）として検出されたが，全ての冷却塔水および BW-F からは検出されなかった．その他の既に記載されているレジオネラ属菌のクラスターに分類されたのは，*L. feeleii*（13 クローン，全体の 2%），*L. lytica*（3 クローン，0.5%），*L. dumoffii*（1 クローン，全体の 0.2%）だった．図 6-5 はクローンライブラリーの構成菌種の割合を示す．冷却塔水は解析したクローンのうち *L. pneumophila* の占める割合が低く，CTW-A が 7.8%，CTW-B が 1.7%，CTW-C が 11.3%，CTW-I が 1.0%であった．一方，浴槽水は冷却塔水と比較すると *L. pneumophila* の占める割合が高く，BW-D が 33.3%，BW-E が 98.6%，BW-F が 49.3%であった．また，冷却塔水では既存種に該当しないレジオネラ属菌のクローンの割合が高いことが読み取れる．

表 6-2 は冷却塔水と浴槽水のレジオネラ属菌分布の多様性指標の比較を，図 6-6 はレジオネラ属菌のクローンライブラリーのレアファクション曲線を示す．各指標を見比べると，浴槽水よりも冷却塔水の方がレジオネラ属菌の多様性が高いことが明らかである．

表 6-2　冷却塔水と浴槽水のレジオネラ属菌分布の多様性指標の比較

Sample	No. of clones analyzed	No. of OTUs obtained	Chao1	Simpson (1/λ)	Shannon-Wiener (*H'*)	Good's coverage (%)
CTW-A	51	11	15	7.87	2.16	92.2
CTW-B	58	17	23	10.60	2.53	87.9
CTW-C	62	16	28	13.32	2.63	87.1
CTW-G	75	8	10	2.08	1.14	96.0
CTW-H	66	19	30	9.71	2.45	84.8
CTW-I	105	29	67	9.91	2.67	82.9
BW-D	65	3	3	1.90	0.71	98.5
BW-E	70	2	2	1.03	0.07	98.6
BW-F	65	7	7	2.58	1.16	96.9

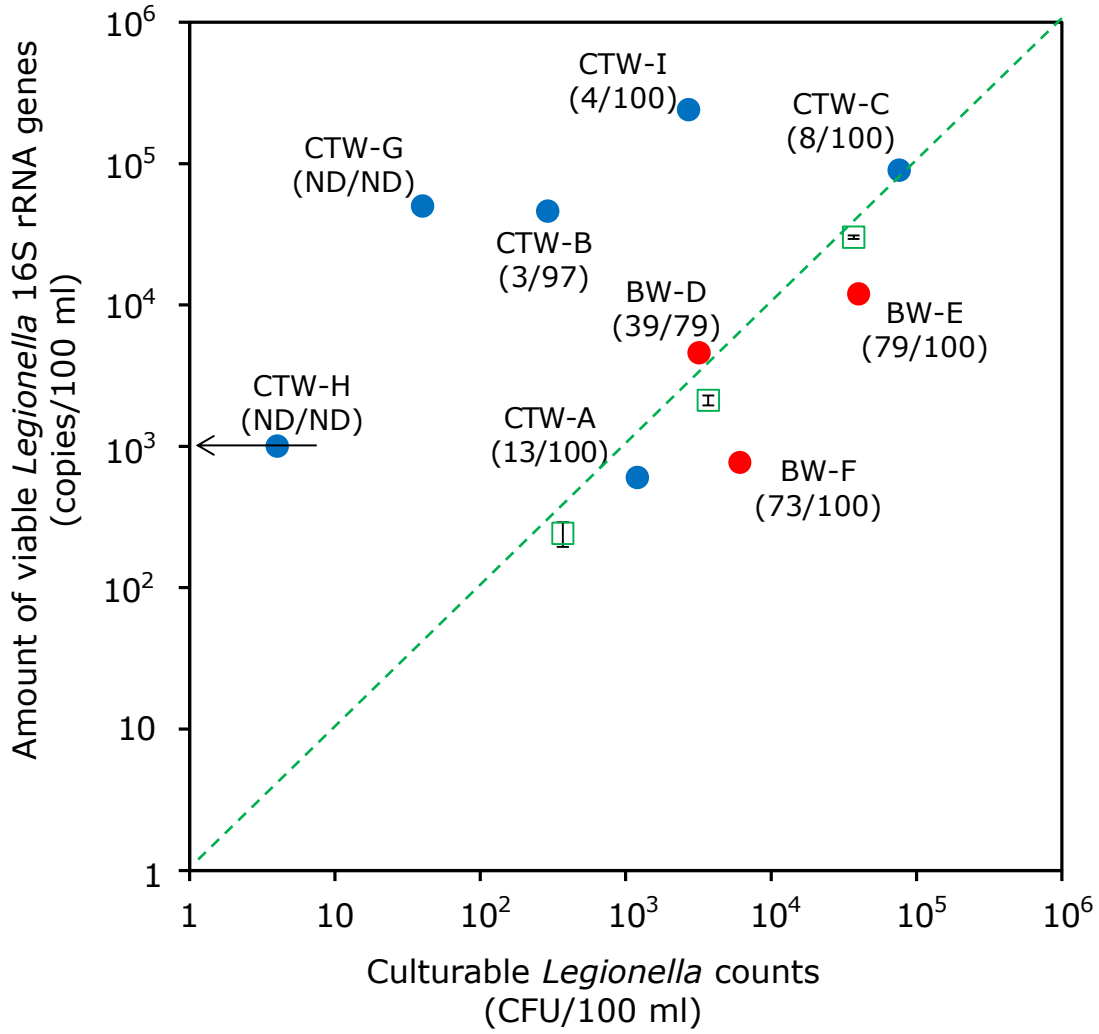

図 6-3　冷却塔水(●)，浴槽水(●)，および *L. pneumophila* ATCC33152 株の段階希釈液(□)から培養法および EMA-qPCR 法で定量したレジオネラ属菌の濃度．　*L. pneumophila* の段階希釈液は，$n = 2$ の平均値をプロットした．CTW-A から-C，-G から-I と BW-D から-F はサンプル ID で，その下の括弧内の数値は全レジオネラ属菌に対する *L. pneumophila* の比率を表す（左が EMA-qPCR 法で求めた *L. pneimophila* の比率，右が培養法で検出した *L. pneumophila* の比率）．ND は不検出を，CTW-H の矢印は培養法のレジオネラ属菌数が 10 CFU/100 ml 未満を示す．*L. pneumophila* の段階希釈液の CFU と 16 S rRNA 遺伝子量には相関が見られた（$y = 0.45x^{1.05}$，$R^2 = 0.996$）．

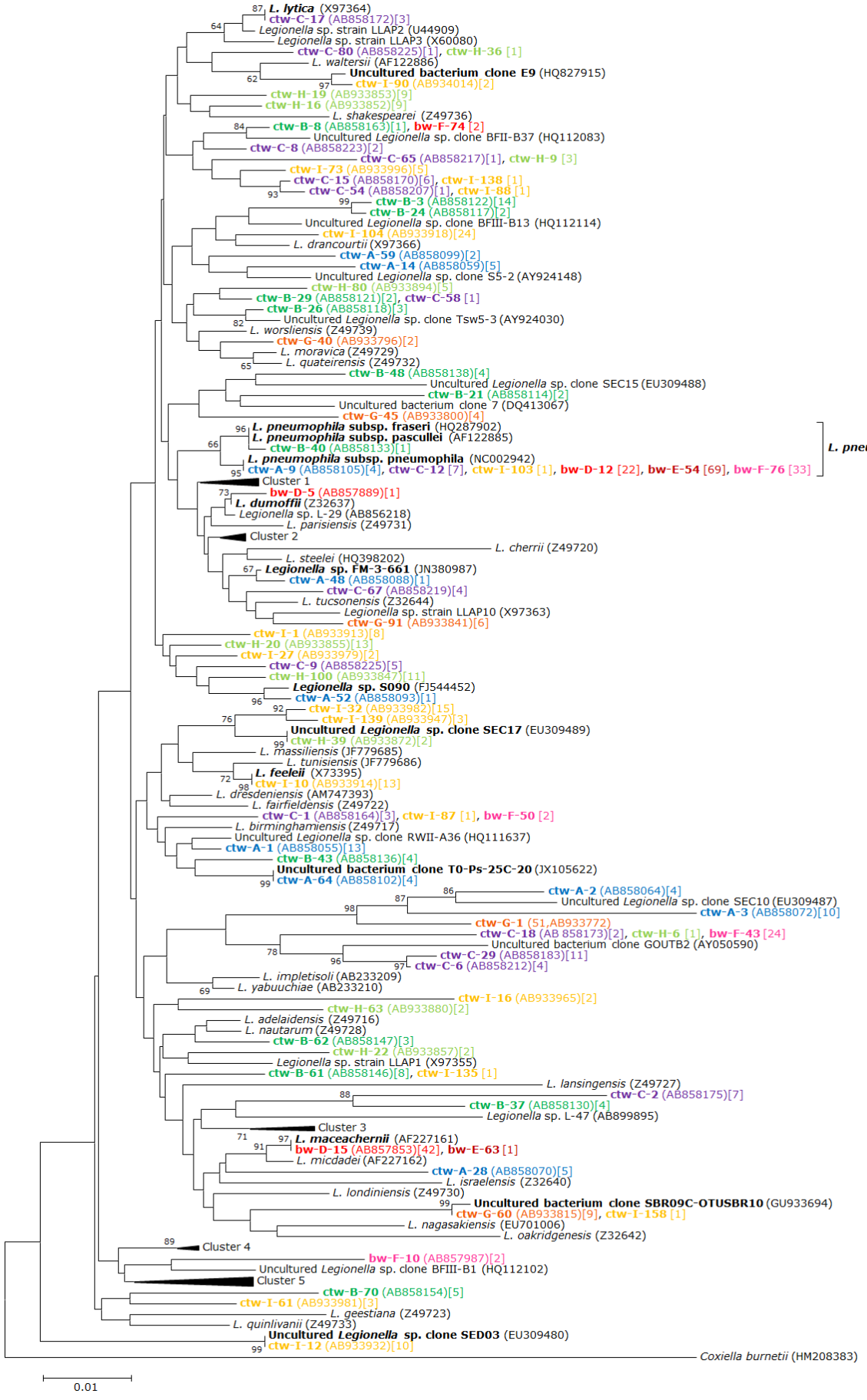

図 6-4　レジオネラ属菌のクローンライブラリー解析結果

図 6-4　脚注

レジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子の部分配列（616 bp）で系統樹（NJ 法）を作成した．本検討で得られた 99 の OTU のうち，複数クローンまたは既報の配列と一致するクローンからなる 63 の OTU の代表クローンを用いた．代表クローンはカラーで示し，丸括弧内にアクセッションナンバー，角括弧内に同一 OTU のクローン数を記載した．節部分の数値はブートストラップ値で 60%以上のものを記載した．

Cluster 1 は *L. anisa* (Z32635), *L. bozemanii* (Z49719), *L. wadsworthii* (Z49738), *L. gormanii* (Z32639), *L. steigerwaltii* (Z49737) を含む．

Cluster 2 は *L. sainthelensi* (Z49734), *L. santicrucis* (HF558374), *L. longbeachae* (AY444740), *L. cicinatiensis* (Z49721), *L. gratiana* (Z49725) を含む．

Cluster 3 は *L. beliardensis* (AF122884), *L. busanensis* (AF424887), *L. gresilensis* (AF122883) を含む．

Cluster 4 は *L. rubrilucens* (Z32643), *L. taurinensis* (DQ667196), *L. erythra* (Z32638) を含む．

Cluster 5 は *L. brunensis* (Z32636), *L. cardiac* (JF831047), *L. hackliae* (M36028), *L. jamestownensis* (Z49726), *L. jordanis* (Z32667), *L. spintensis* (M36030) を含む．

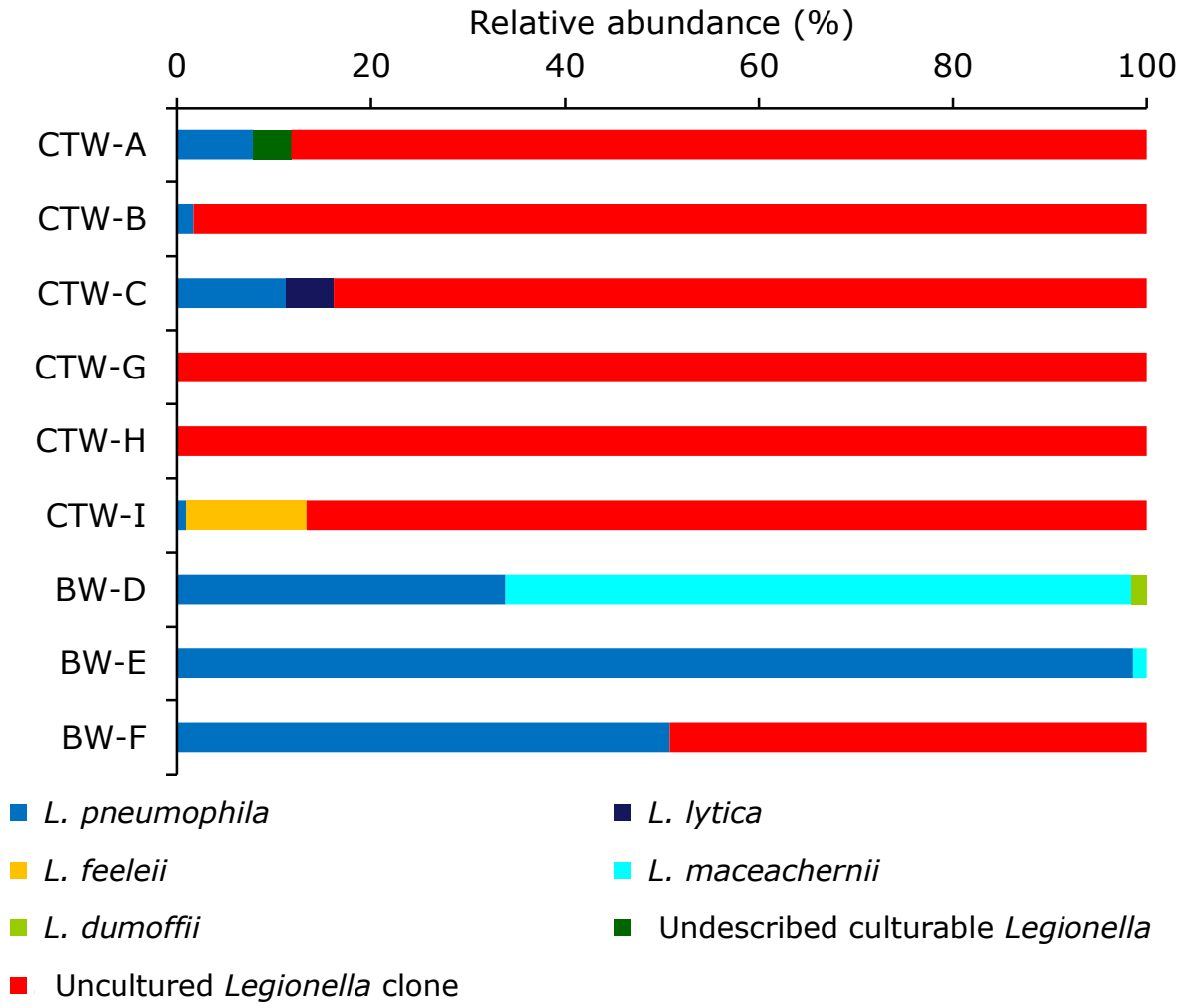

図 6-5　レジオネラ属菌のクローンライブラリー構成クローンの相対量

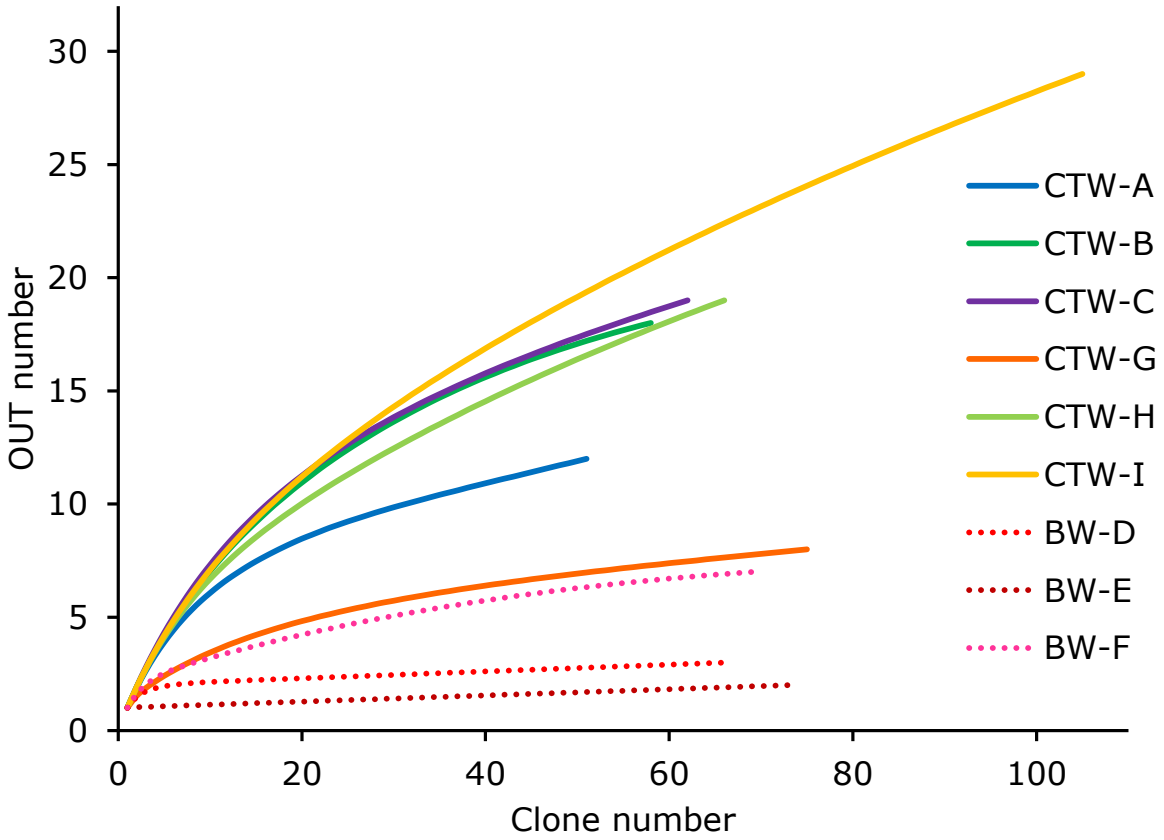

図 6-6　レジオネラ属菌のクローンライブラリーのレアファクション曲線

冷却塔水は実線で，浴槽水は点線で示した．

6.3　考察

本章では培養法で検出することが困難なレジオネラ属菌を EMA-qPCR 法で広く検出できることを示し，冷却塔水には多くの種類の既存種に属さないレジオネラ属菌が生息することを EMA-PCR の増幅産物のクローンライブラリー解析により明らかにした．

表 6-2 に示した Good's coverage は 82.9%から 98.6%を示しており，今回の検討において，レジオネラ属菌の菌叢を構成する主要な菌種は検出できたと考える．また，図 6-3 に示した EMA-qPCR 法の結果から求めた *L. pneumophila* の比率と図 6-4 に示したクローンライブラリーの解析結果から求めた *L. pneumophila* のクローンの比率は概ね一致しており，これらの結果は妥当と考える．

レジオネラ属菌の菌叢が冷却塔水と浴槽水で異なることは興味深い（図 6-4，図 6-5）．浴槽水では単純な菌叢を示すのに対し，冷却塔水では多様化が進んでいる．これは恐らく水系の洗浄頻度が関係するのだろう．浴槽水では定期的に水系を高濃度の塩素により洗浄するため，レジオネラ属菌が多様化できないのかもしれない．著者らの最近の報告（井上ら，2013）によると，冷却塔水のレジオネラ属菌に対しては塩素系殺菌剤の効果が認められなかった．CTW-I のレジオネラ属菌の多様化が進んだのは，CTW-I が安定化塩素剤処理だったからかもしれない．水系およびその処理状況とレジオネラ属菌の多様化の関係については今後更なる検討が必要と考える．

BW-D および BW-E からは *L. maceachernii* のクローンが得られたが，培養法では *L. maceachernii* を検出できなかった．別の実験で，著者らは *L. maceachernii* を冷却塔水から培養法で検出した（Inoue *et al*., 2007）ため，今回 *L. maceachernii* を培養法で検出できなかったのは，*L. maceachernii* が VBNC として存在したか，もしくは培地上で *L. pneumophila* と競合して発育できなかったためと推察する．一方，*Legionella* sp. L-29 と *Legionella* sp. LC2720 はクローンライブラリー解析で検出されなかったが，培養法で得られたこれらの菌数は低かったため，検出できなかったものと推察する．

多くのクローン（390 クローン，全体の 63%）がこれまでに報告のあるレジオネラ属菌やクローンの塩基配列（Alfreider *et al*., 2004; Wullings *et al*., 2006; Wéry *et al*., 2008; Corsao *et al*., 2010; Wullings *et al*., 2011）との一致率が 99%未満だったが，30 クローン（7 OTU）は以下のクローンと一致率が高かった．ctw-I-12 を代表とする 10 クローンは冷却塔水から得られた uncultured *Legionella* sp. clone SEC03（Wéry *et al*., 2008）と 100%の一致率，ctw-G-60 を代表とする 10 クローンは排水処理装置から得られた uncultured bacterium clone SBR09C-OTUSBR10（アクセッションナンバーは GU933694）と 99.8%の一致率，ctw-A-64 を代表とする 4 クローンは水族館の水管から得られた uncultured bacterium clone

T0-Ps-25C-20（Vlahos *et al*., 2013）と 99.7%の一致率，ctw-H-39 を代表とする 2 クローンは冷却塔水から得られた uncultured *Legionella* sp. clone SEC17（Wéry *et al*., 2008）と 99.7%の一致率，ctw-I-90 を代表とする 2 クローンは富栄養湖の藍藻マットから得られた uncultured bacterium clone E9（アクセッションナンバーは HQ827915）と 99.5%の一致率だった．このように様々な環境試料から同一のクローンが得られることは，これらのレジオネラ属菌が各地に広く分布していることを示しており大変興味深い．

本章では，培養法は環境水中に生息するレジオネラ属菌のごく一部しか検出できないことを EMA-qPCR 法とクローンライブラリー解析によって明らかにした．特に冷却塔水には培養法で検出困難な既存種に該当しないレジオネラ属菌が種類，量ともに多く存在するため，環境水中のレジオネラ属菌汚染の実態を解明するためには，培養法だけでなく EMA-qPCR のような遺伝子検出法も組み合わせて，総合的に判断する必要があるだろう．

第 4 部　おわりに

第 7 章　総合討論

レジオネラ症が新たな感染症と認知されてから既に 30 年以上が経つ．国立感染症研究所感染症疫学センターの報告（2013）によると，日本国内で 2008 年 1 月から 2012 年 12 月末までに，31 例の無症状病原体保有者を含む 4081 例（うち 134 例は死亡）のレジオネラ症が報告されており，レジオネラ症は今後も注意されるべき感染症のひとつである．本来レジオネラ属菌は自然環境中に広く生息しているとされ，古畑ら（2002）は日本全国の土壌にレジオネラ属菌が生息していることを報告している．これらの自然環境に生息するレジオネラ属菌が冷却塔水や浴槽水などの人工の水環境に入り込み，レジオネラ属菌汚染が広がりレジオネラ症の原因となる．すなわち，人類が便利さを求めて様々な人工水環境を造り上げた結果として，レジオネラ症が一般的な感染症となり広がっていると言えるだろう．したがって，これらの人工水環境を安全に利用するためにはレジオネラ属菌の制御が必須で，そのためにはレジオネラ属菌汚染の実態把握のためのレジオネラ属菌検査を欠かすことはできない．

第 2 部（第 2，3 章）では培養法によるレジオネラ属菌検査の問題となる選択培地上の夾雑微生物による汚染によってレジオネラ属菌の発育が抑制されることの対策として，前処理に用いる酸性緩衝液を改良し，新規選択培地 CATαを開発して夾雑微生物汚染を低減させることに成功した．重要なことは如何にレジオネラ属菌の発育を抑制せずにレジオネラ属菌以外の夾雑微生物の発育を抑制するかということである．ただし，低 pH 耐性や抗生物質感受性がレジオネラ属菌と似通った夾雑微生物の場合，その影響を除去することは技術上難しく，前処理等の強化により夾雑微生物を処理すれば，レジオネラ属菌の発育にも少なからず影響があるかもしれない．しかし，著者は環境水の検査においては夾雑微生物の影響でレジオネラ属菌が全く検出できないよりも，たとえレジオネラ属菌の発育が若干の影響を受けたとしても，夾雑微生物の発育を抑制してレジオネラ属菌を検出できるほうが望ましいと考えている．

第 3 部の第 4 章では PCR 法や LAMP 法を用いて浴槽水からレジオネラ属菌の遺伝子を短時間で検出する方法を検討した．レジオネラ属菌の培養法では培地上にコロニーを形成する能力を持つレジオネラ属菌の生菌のみを検出するが，遺伝子検出法では生菌に加え，死菌，VBNC 菌や残留 DNA のみでも検出する．また，培養法と遺伝子検出法の検出感度の違いや遺伝子増幅反応の阻害物質などの要因も存在する．したがって，培養法の結果と遺伝子検出法の結果を完全に一致させることは難しく，むしろ結果を一致させようと試みるこ

とに無理がある．しかしながら，レジオネラ属菌の培養法では結果を得るまでに 1 週間以上を要するため，数時間で結果が得られる遺伝子検出法の結果から培養法の結果推測が可能となれば，遺伝子検出法は水系のレジオネラ属菌管理のための極めて有効な手法となる．浴槽設備を 500 mg/L 程度の高濃度の遊離塩素で洗浄することで，レジオネラ属菌が殺菌されるだけでなく，その DNA まで分解されるため，遺伝子検出法が有効に活用できることを示したが，これは評価方法に応じて洗浄方法を変えることで適切な評価結果が得られるということを示している．すなわち，培養法で洗浄効果を評価するのであれば生菌が検出されなくなるレベルの洗浄で構わないが，遺伝子検出法で洗浄効果を評価するのであれば DNA まで分解されるレベルの洗浄が求められ，そうすることで遺伝子検出法により数時間のうちにレジオネラ属菌の不検出の判定が有効にできることを本研究により明らかにした．

第 3 部の第 5 章では EMA-qPCR 法を用いて浴槽水や冷却塔水からレジオネラ属菌の生菌に由来する遺伝子を検出する方法を検討した．浴槽水の場合は EMA 処理によりレジオネラ属菌の死菌に起因すると考えられる PCR 法の陽性率が減少したため，EMA-qPCR 法は浴槽水のレジオネラ属菌の迅速検査方法として有効に活用できると考える．一方，冷却塔水の場合は EMA 処理の前後で PCR 法の陽性率に変化がなく，EMA 処理の効果は認められなかった．この要因として冷却塔水中には培養法で検出できないレジオネラ属菌が多く生息している可能性が推察された．

第 3 部の第 6 章では EMA-qPCR 法とクローンライブラリーによる冷却塔水，浴槽水のレジオネラ属菌の多様性を解析した．その結果，特に冷却塔水には培養法で検出されない既存種に該当しない未知のレジオネラ属菌が多く存在することが示唆された．そのため，第 5 章の冷却塔水を用いた検討においては，EMA 処理によりレジオネラ属菌の死菌の DNA 増幅を抑制したとしても，培養法で検出できないレジオネラ属菌の生菌が存在し，EMA-qPCR 法の陽性率が高かったと推察する．これまで，培養法によるレジオネラ属菌検査の結果から環境水に生息するレジオネラ属菌の優占種は *L. pneumophila* とされているが（古畑ら, 1998; 古畑ら, 2004），本研究においてこれまで培養法では見えていなかったレジオネラ属菌が多数存在することが明らかとなった．環境中に存在するレジオネラ属菌の状態と検出の範囲を示す概念図は図 7-1 のように予測されるだろう．これまでも VBNC 状態のレジオネラ属菌の存在は指摘されており（Yamamoto *et al*., 1993; 山本, 1997; Ng *et al*., 1997），既存種に該当しないレジオネラ属菌の存在も示されていた（Alfreider *et al*., 2004; Wullings *et al*., 2006; Wéry *et al*., 2008; Corsao *et al*., 2010; Wullings *et al*., 2011）が，本研究により特に冷却塔水では *L. pneumophila* の存在比率が低く，培養法で検出できないレジオネラ属菌の比率が高いことが明らかになった．

一般に環境中に生息する細菌のほとんどは培養法で検出できないとされるが，レジオネ

ラ属に限定しても同様に培養法で検出できない種類が多く存在することが示唆された．環境水中のレジオネラ属菌を検出する方法は多数存在するが，それらの検出方法を複数組み合わせながら総合的に解析することがレジオネラ属菌汚染の解明には必要であり，今回得られた知見は環境水のレジオネラ属菌汚染の全容解明の足掛かりになることが期待される．

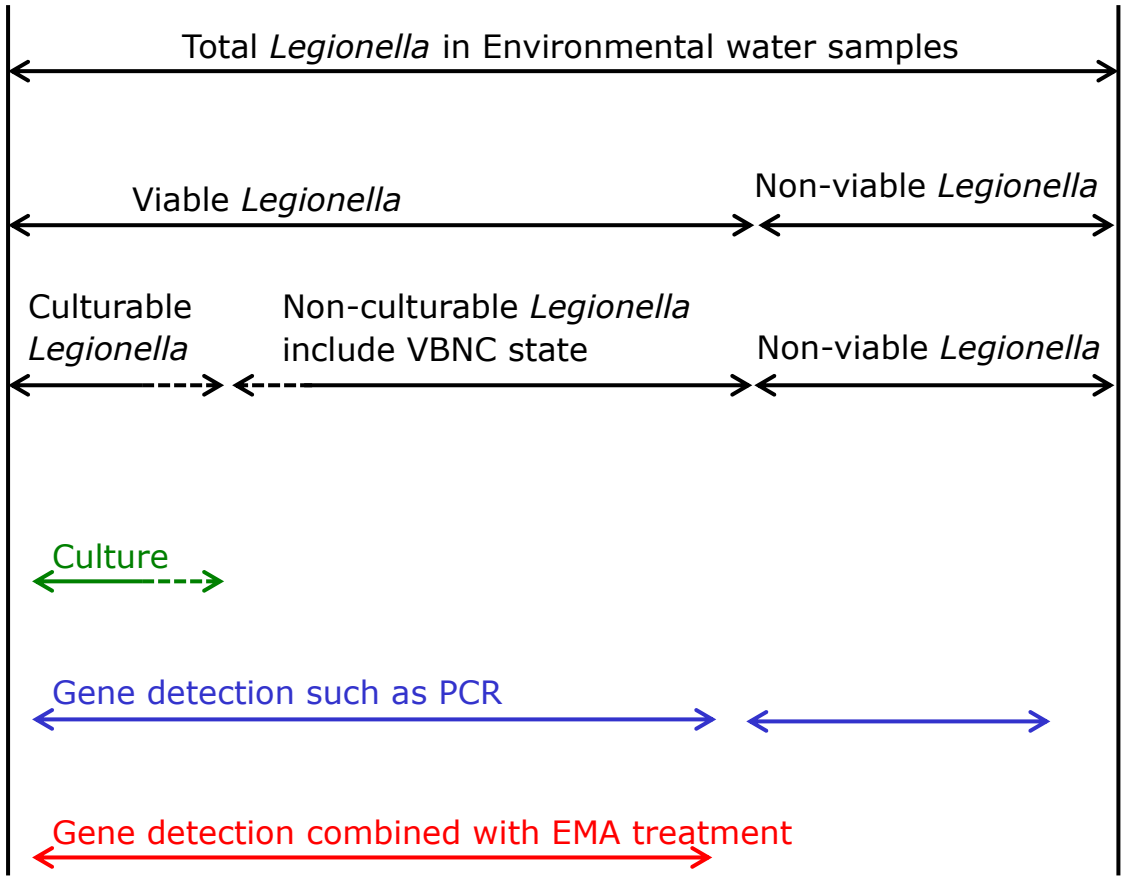

図 7-1　環境水に生息するレジオネラ属菌の状態と培養法，遺伝子検出法で検出可能な範囲に関する概念図.

参考文献

財団法人ビル管理教育センター（2009）レジオネラ症防止指針第 3 版

財団法人ビル管理教育センター（1999）新版レジオネラ症防止指針

財団法人ビル管理教育センター（1994）レジオネラ症防止指針

International organization for standardization (1998) Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*, ISO11731

Jones, G.L. and Hébert, G.A. 編，竹田美文，本田武司，三輪谷俊夫　訳（1981）レジオネラ症“LEGIONNAIRES’”the disease, the bacterium and methodology，近代出版

Harrison, T.G. and Taylor, A.G. (1988) A laboratory manual for *Legionella*, John Wiley & Sons Ltd.

引用文献

Adeleka, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., and Fields, B. (1996) *Legionella*-like amoebal pathogens-phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerging Infectious Diseases*, **2**, 225-230.

縣　邦雄 (2010) レジオネラ属菌の制御方法. 防菌防黴誌, **38**, 259-271.

Alfreider, A., Vogt, C., and Babel, W. (2004) Microbial diversity in an *in situ* reactor system treating monochlorobenzene contaminated ground water as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Syst. Appl. Microbiol.*, **25**, 232-240.

Allen, P. M., and Gottlieb, D. (1970) Mechanism of action of the fungicide thiabendazole, 2-(41-tiazolyl) benzimidazole. *Appl. Microbiol.*, **20**, 919-926.

Al-Soud, W.A., and Rådström, P. (2001) Purification and characterization of PCR- inhibitory components in blood cell. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 485-493.

安中敏光 (2003) 遺伝子を標的とした感染症の迅速検査法の進歩，LAMP 法による *Legionella* 属菌の検出. *JARMAM*, **14**, 25-30.

安中敏光，吉野　学，百田隆祥，根本二朗，砂田亜津子，小島　禎，池戸正成，石井良和，山口惠三 (2003) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法によるレジオネラ属菌の検出. 日本臨床微生物学雑誌, **13**, 19-25.

安中敏光，小島　禎，池戸正成，古畑勝則 (2004) LAMP 法による環境水からの *Legionella* 属菌の検出. 防菌防黴誌, **32**, 195-201.

Beige, J., Lokies, J., Schaberg, T., Finckh, U., Fischer, M., Mauch, H., Lode, H., Köhler, B., and Rolfs, A. (1995) Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 90-95.

Bej, A.K., Mahbubani, M.H., and Atlas, R.M. (1991) Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 597-600.

Bopp, C. A., Sumner, J. W., Morris, G. K., and Wells, J. G. (1981) Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. *J. Clin. Microbiol.*, **13**, 714-719.

Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., and McDade, J.E. (1979) Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann. Intern. Med.*, **90**, 656-658.

Campocasso, A., Boughhalmi, M., Fournous, G., Raoult, D., and La Scola, B. (2012) *Legionella tunisiensis* sp. nov., and *Legionella massiliensis* sp. nov., isolated from environmental water samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **62**, 3003-3006.

Chang, B., Sugiyama, K., Taguri, T., Amemura-Maekawa, J., Fumiaki, K., and Watanabe, H. (2009) Specific Detection of Viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide PCR/real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 147-153.

Chang, B., Taguri, T., Sugiyama, K., Amemura-Maekawa, J., Fumiaki, K., and Watanabe, H. (2010) Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **63**, 119-123.

Chen, N.T. and Chang, C.W. (2010) Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. *J. Appl. Microbiol.*, **109**, 623-634.

Corsaro, D., Pages, G.S., Catalan, V., Loret, J.F., and Greub, G. (2010) Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **213**, 158-166.

Dennis, P. J., Bartlett, C. L. R., and Wright, A. E. (1984a) Comparison of isolation methods for *Legionella* spp.. Proceedings of the 2nd international symposium, Washington DC, Am. Soc. Microbiol., 294-296.

Dennis, P. J., Green, D., and Jones, B. P. C. (1984b) A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 349-350.

Delgado-Viscogliosi, P., Solignac, L., and Delattre, J.M. (2009) Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3502-3512.

Edelstein, P. H. (1981) Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **14**, 298-303.

Edelstein, P. H. (1982) Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from portable water. *J. Clin. Microbiol*., **16,** 697-699.

Edelstein, P. H., Edelstein, M.A., Shephard, L.J., Ward, K.W., and Ratcliff, R.M., (2012) *Legionella steelei* sp. nov., isolated from human respiratory specimens in California, USA, and south Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **62**, 1766-1771.

Feeley, J.C., Gorman, G.W., Weaver, R.E., Mackel, D.C., and Smith, H.W. (1978) Primary isolation medium for Legionnaires' disease bacterium. *J. Clin. Microbiol.* **8**, 320-325.

Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C., and Baine, W.B. (1979) Charcoal-yeast extract agar: Primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 437-441.

Fields, B.S., Benson, R.F., and Besser R.F. (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 year of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 506-526.

Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., *et al*. (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **297**, 1189-1197.

Fraser, D.W., Wachsmuth, I.K., Bopp, C., Feeley, J.C., and Tsai, T.F. (1978) Antibiotic treatment of guinea pigs infected with agent of Legionnaires' disease. *Lancet*, **Jan 28**, 175-148.

古畑勝則 (1998) 水環境におけるレジオネラ属菌の汚染と制御. 日本食品微生物学会雑誌. **15**, 1-9.

古畑勝則，岡部弥穂，堂ヶ崎知格，原　元宣，福山正文 (2002) 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴誌, **30**, 555-561.

古畑勝則，原　元宣，吉田真一，福山正文 (2004) 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況. 感染症学雑誌, **78**, 710-716.

Hoffman, P.S., Pine, L., and Bell, S. (1983) Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 784-791.

Hookey, J.V., Saunders, N.A., Fry, N.K., Birtles, R.J., and Harrison, T.G. (1996) Phylogeny of Legionellaceae based on small-subunit ribosomal DNA sequence and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 526-531.

Inoue, H., Kawano, G., Nagasawa, H., and Sakuda, S. (2002) Isolation of elemental sulfur as a self-growth-inhibiting substance produced by *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4809-4811.

Inoue, H., Yajima, Y., Kawano, G., Nagasawa, H., and Sakuda, S. (2004) Isolation of indole-3-aldehyde as a growth inhibitor of *Legionella pneumophila* from Diaion HP-20 resins used to culture the bacteria. *Biocontrol Sci.*, **9**, 39-41.

Inoue, H., Takama, T., Agawa, Y., Onodera, J., Ishima, T., Agata, K., Saitoh, K., and Furuhata, K. (2007) Evaluation of Duopath Legionella kit for the rapid identification of *Legionella* strains isolated from water samples. *Biocontrol Sci.*, **12**, 155-158.

井上浩章，高間朋子，石間智生，縣　邦雄 (2013) 各種水利用設備のレジオネラ属菌検出実態. 日本防菌防黴学会誌, **41**, 659-661.

春日　修，高木紀美子，谷　佳都，絹巻明生 (1999) 環境由来レジオネラ属菌の分離方法に関する検討. 感染症学雑誌, **73**, 25-34.

春日　修，三沢　均，高木紀美子，谷　佳都，池戸正成 (2002) 環境水由来レジオネラ属菌の選択培地による効率的検出法の検討. 感染症学雑誌, **76**, 41-50.

厚生労働省健康局長通知 (2003) 公衆浴場における水質基準等に関する指針，公衆浴場における衛生管理要領等の改正について. 健発第 0214004 号.

国立感染症研究所感染症疫学センター (2013) 病原微生物検出情報. **34**, 155-156.

Kuroki, H., Miyamoto, H., Fukuda, K., Iihara, H., Kawamura, Y., Ogawa, M., Wang, Y., Ezaki, T., and Taniguchi, H. (2007) *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial in Japan. *Syst. Appl. Microbiol.*, **30**, 273-279.

La Scola, B., Birtles, R.J., Greub, G., Harrison, T.J., Ratcliff, R.M., and Raoult, D. (2004) *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 699-703.

Liebers, D. M., Baltch, A. L., Smith, R. P., Hammer, M. C., and Conroy, J. V. (1989) Susceptibility of *Legionella pneumophila* to eight antimicrobial agents including four macrolides under different assay condition. *J. Antimicrob. Chemother.*, **23**, 37-41.

Lin, A., Stout, J.E., Rihs, J.D., Vickers, R.M., and Yu, V.L. (1999) Improved *Legionella* selective media by the addition of fluconazole: results of in vitro testing and clinical evaluation. *Diagn. Micribiol. Infect. Dis.*, **34**, 173-175.

Lück, P.C., Jacobs, E., Röske, I., Schröter-Bobsin, U., Dumke, R., and Gronow, S. (2010) *Legionella dresdenensis* sp. nov., isolated from river water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60**, 2557-2562.

McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., and Dowdle, W.R. (1977) Legionnaires' disease isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.*, **297**, 1197-1203.

Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Miller, R., Haff, L., DiCesare, J., and Atlas, R.M. (1990) Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol. Cell. Probes*, **4**, 175-187.

Malloch, David. (1981) Moulds: their isolation, cultivation, and identification. University of Toronto press, Canada.

Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T., and Yoshida, S. (1997) PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of Legionellae in hospital cooling tower water. *Appl. Environ. Microbiol*., **63**, 2489-2494.

Nogva, H.K., Dromtorp, S.M., Nissen, H., and Rudi, K. (2003) Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*, **34**, 804-813.

Ng, D.L.K., Koh, B.B., Tay, L. and Heng, B.H. (1997) Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of legionellae in cooling tower waters in Singapore. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**, 214-216.

Nishizawa, T., Komatsuzaki, M., Kaneko, N., and Ohta, H. (2008) Archaeal diversity of upland rice field soils assessed by the terminal restriction fragment length polymorphism method combined with real time quantitative-PCR and a clone library analysis. *Microbes Environ*., **23**, 237-243.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **28**, e63.

岡崎美樹，小出道夫，斉藤　厚 (1998) 造園業者に発症した *Legionella longbeachae* 肺炎の 1 例. 感染症学雑誌, **72**, 1076-1079.

奥田敬一，池戸正成，薮内英子 (1984) 冷却塔水から *Legionella* 属菌を検出するための新選択培地：Wadowsky-Yee-Okuda (WYO) 培地. 感染症学雑誌, **58**, 1073-1082.

Park, M.-Y., Ko, K.S., Lee, Park, M.-S., and Kook, Y.-H. (2003) *Legionella busanensis* sp.nov., isolated from cooling tower water in Korea. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 77-80.

Pearce, M.M., Theodoropoulos, N., Mandel, M.J., Brown, E., Reed, K.D., and Cianciotto, N.P. (2012) *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **62**, 2946-2954.

Piao, Z., Sze, C.C., Barysheva, O., Iida, K., and Yoshida, S. (2006) Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1613-1622.

Pine, L., George, J. R., Reeves, M. W., and Harrell, W. K. (1979) Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.*, **9**, 615-626.

Prince, A.M., and Andrus, L. (1992) PCR: How to kill unwanted DNA. *BioTechniques*, **12**, 358-360.

Qin, T., Tian, Z., Ren, H., Hu, G., Zhou, H., Lu, J., Luo, C., Liu, Z., and Shao, Z. (2012) Applicationof EMA-qPCR as a complementary tool for the detection and monitoring of *Legionella* in different water systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 1881-1890.

Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin. Pathol.*, **33**, 1179-1183.

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., and Painter, P. R. (1986) The microbial world (5th edition). Prentice-Hall, New Jersey.

Tison, D.L., Pope, D.H., Cherry, W.B., and Fliermans, C.B. (1980) Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 456-459.

Vlahos, N., Kormas, K.A., Pachiadaki, M.G, Meziti, A, Hotos, G.N, and Mente, E. 2013. Cange of bacterioplankton apparent species richness in two ornamental fish aquaria. *SpringerPlus*, **2**, 66.

Watson, R.J., and Blackwell, B. (2000) Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*, **46**, 633-642.

Wéry, N., Bru-Adan, V., Minervini, C., Delgénes, J.P., Garrelly, L, and Godon, J.J. 2008. Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3030-3037.

Wullings, B.A., and van der Kooij, D. 2006. Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 157-166.

Wullings, B.A., Bakker, G., and van der Kooij, D. 2011. Concentration and diversity of uncultured *Legionella* spp. in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 634-641.

藪内英子，王　笠，矢野郁也，山吉孝雄，荒川迪生 (1995a) *Legionella* 属菌に対する塩素の殺菌効果．感染症学雑誌, **69**, 151-157.

藪内英子ら (1995b) *Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever の集団発生例Ⅱ．疫学調査結果．感染症学雑誌, **69**, 654-665.

藪内英子，縣　邦雄 (2004) 日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生．感染症学雑誌, **78**, 90-98.

山下直哉ら (1998) 新生児レジオネラ肺炎の 4 例．日本小児科学会雑誌, **102**, 323.

Yamamoto, H., Hashimoto, Y., and Ezaki, T. (1993) Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 617-622.

山本啓之 (1997) *Legionella* 属細菌の生態とレジオネラ症. *Microbes Environ.*, **12**, 149-156.

Yang, G., Benson, R.F., Ratcliff, R.M., Brown, E.W., Steigerwalt, A.G., Thacker, W.L., Daneshvar, M.I., Morey, R.E., Saito, A., and Fields, B.S. (2012) *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **62**, 284-288.

吉田真一，宮本比呂志，小川みどり (1995) レジオネラ属菌の比較生物学―宿主との相互関係を中心として―. 日本細菌学雑誌, **50**, 745-764.

謝辞

茨城大学農学部の太田寛行教授には，論文博士の学位審査申請に際してご推薦いただくとともに，本論文の取りまとめをはじめ，多岐に亘る懇切丁寧なご指導およびご高配を賜りましたことに甚大なる感謝の意を表します．

東京農工大学農学部の片山葉子教授，宇都宮大学農学部の関本　均教授，茨城大学農学部の久留主泰郎教授，茨城大学農学部の成澤才彦教授には本論文のまとめに際してご指導を賜りました．

本論文はアクアス株式会社つくば総合研究所にて行った研究内容をまとめたもので，アクアス㈱つくば総研の縣　邦雄所長，河野　源顧問にはすばらしい研究の場を与えていただき，様々なご指導およびご助言を賜り，そして温かく見守ってくださいました．

アクアス㈱つくば総研分析センターの岩澤智幸センター長，つくば総研の石間智生副所長には様々なご支援，ご指導をいただきました．

アクアス㈱つくば総研の高間朋子さん，野田晃子さん，阿川友紀子さん，馬場ますみさんには膨大な数のレジオネラ属菌検査を担当していただき，そして本研究に関する様々なご支援をいただきました．この方々の確かな技術力と日々の地道な検査業務より得られた結果が本論文の土台を支えており，それらがあったからこそ本論文が完成したと言っても過言ではありません．

アクアス㈱つくば総研派遣社員の森下麻子さんには特に分子生物学実験をご支援いただきました．

帝京大学理工学部の梶谷正行教授には分子生物学実験について基礎からご指導いただきました．

茨城大学農学部の藤村玲子博士にはクローニング等の実験手法を，郭永博士にはクローンライブラリーの多様性解析手法についてご指導いただきました．

アクアス㈱つくば総研の皆様，茨城大学農学部環境毒性化学研究室の皆様には本研究を進める上で様々なご協力をいただきました．

東京大学大学院農学生命科学研究科の作田庄平准教授には英文での論文執筆について懇切丁寧なご指導をいただきました．また，地道な研究活動を楽しみながら続けていられるのは学生時代の恩師である東京大学名誉教授，元帝京大学理工学部教授の大岳　望先生（故人），元帝京大学理工学部教授の西村敏男先生の教えによるものです．

ご指導，ご支援，ご協力いただきました全ての皆様方に心より厚く御礼申し上げます．

最後に，本論文をまとめるには日々の家族の支えが不可欠でした．

特に妻と子供たち，そして両親に「ありがとう」．

付記

本論文はアクアス㈱と茨城大学の共同研究，アクアス㈱と栄研化学株式会社の共同研究，およびアクアス㈱とタカラバイオ株式会社が共同で実施した検討の一部を含む．
また，下記の雑誌論文の内容をまとめたものである．

第 2 章

Inoue, H., Iwasawa, T., Saruwatari, Y., and Agata, K. (2004) Improved acid pretreatment for the detection of *Legionella* species from environmental water samples using the plate culture method. *Biocontrol Sci.*, **9**, 43-50.

第 3 章

Inoue, H., Noda, A., Takama, T., Ishima, T., and Agata, K. (2006) Enhanced antifungal effect of the selective medium for the detection of *Legionella* species by a combination of cycloheximide, amphotericin B and thiabendazole. *Biocontrol Sci.*, **11**, 69-74.

井上浩章, 高間朋子, 馬場ますみ, 石間智生, 縣 邦雄 (2014) 環境水のレジオネラ属菌検査のための新規選択培地（CATα培地）による夾雑菌汚染の低減効果. 日本防菌防黴学会誌, **42**, 349-351.

第 4 章

井上浩章, 野田晃子, 縣 邦雄 (2004) *Legionella pneumophila* の塩素，過酸化水素殺菌時の PCR 法による検出挙動. 防菌防黴誌, **32**, 383-386.

井上浩章, 野田晃子, 縣 邦雄, 安中敏光, 小島 禎, 渡 一, 池戸正成 (2004) LAMP 法，PCR 法を用いた浴槽水レジオネラ属菌の迅速検査に関する調査研究. 防菌防黴誌, **32**, 481-487.

第 5 章

Inoue, H., Takama, T., Yoshizaki, M., and Agata, K. (2015) Detection of *Legionella* species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment. *Biocontrol Sci.*, **20**(1), in press.

第 6 章

Inoue, H., Fujimura, R., Agata, K., and Ohta, H. (2015) Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. *Microbes Environ.*, **30**(1), in press.